

**Einfluß der Zelloberfläche
auf den Biopterintransport bei
*Crithidia fasciculata***

Tomaz Langenbach

1976

Einfluß der Zelloberfläche auf den Biopterintransport
bei *Crithidia fasciculata*

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München



vorgelegt von

Tomaz Langenbach

aus

Rio de Janeiro

1976

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit zwischen März 1973 und Oktober 1975 im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter Anleitung von Professor Dr. H. Rembold durchgeführt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: Juni 1976

INHALTSVERZEICHNIS

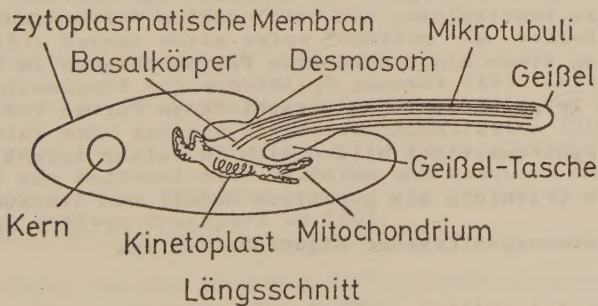
EINLEITUNG	1 - 9
MATERIAL UND METHODEN.	10 - 15
1. Crithidia-Züchtung	10
2. Ernten der Crithidiazellen	10
3. Bestimmung der Zellkonzentration	11
4. Proteinbestimmung	11
5. Bestimmung des cytosolischen pH-Werts	11
6. Sauerstoff-Bestimmung	11
7. Invertase-(β -D-Fructofuranosidase, EC 3.2.1.24.)- Bestimmung	11
8. Messung der Inkorporation markierter Isotope in Crithidia	13
9. Erzeugung von Antikörpern	14
10. Aggregationsfähigkeit der Crithidiazellen	14
11. Osmotischer Schock der Crithidiazellen	15
ERGEBNISSE	16 - 46
1. Morphologische und physiologische Veränderungen der Crithidiazellen bei Entwicklung in Kulturflüssigkeit	16
1.1 Einfluß der Wachstumsdauer auf die Differenzierung	17
1.2 Einfluß des pH-Werts auf die Differenzierung	18
1.3 Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die Atmung	20
1.4 Invertase-Aktivität bei Crithidia fasciculata	21
2. Hemmung des Biopterintransports durch Colchicin	24
2.1 Einfluß von Colchicin, Lumicolchicin und Vincristin	24
2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Colchicinhemmung	27

2.3	Art der Colchicinhemmung	28
2.4	Bioplerinabfluß	30
2.5	Abhängigkeit des durch Colchicin gehemmten Bioplerintransports vom Entwicklungszustand der Crithidia	32
2.6	Zur Biopterinspezifizität der Colchicinhemmung .	36
2.7	Bindung des Colchicins an die Membranoberfläche .	37
2.8	Schwankungen in der Colchicinbindung	40
3.	Behandlung der Membranoberfläche	42
3.1	Einfluß von osmotischem Schock auf den Bioplerintransport	42
3.2	Einfluß der Protease-Behandlung auf den Bioplerintransport	45
DISKUSSION		47 - 52
ZUSAMMENFASSUNG		53
LITERATURVERZEICHNIS		54 - 65

EINLEITUNG

Eine Reihe von Trypanosomen sind Krankheitserreger bei Menschen und Tieren. Beim Menschen sind dies vor allem die Erreger der Schlafkrankheit (durch *Trypanosoma rhodesiense* (1) und *T. gambiense* (2)) und der Chagas-Krankheit (durch *T. cruzi* (3)).

Die Trypanosomen besitzen einen Zellkern und einen Kinetoplasten mit DNA und einem großen Mitochondrium (vgl. schematische Zeichnung). Der Kinetoplast liegt am Basalkörper an, von dem die Mikrotubuli der Geißeln ausgehen. Die Geißel besteht aus 9 Mikrotubuli, die kreisförmig um zwei weitere zentral liegende Mikrotubuli angeordnet sind. Die zytoplasmatische Membran der Zelle hat an der Innenseite ebenfalls Mikrotubuli. Ausgehend vom Basalkörper erstrecken sie sich in paralleler Anordnung über die ganze Zellwand (4). An der Austrittsstelle der Geißel befindet sich eine Geißeltasche (flagellar pocket) als eine Art Vakuole, die einige katabolische Enzyme enthält und durch ein Desmosom mit dem Außenmedium verbunden ist (5).



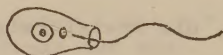
Die Trypanosomen zeigen einen sehr komplexen Polymorphismus, der ihnen eine Anpassung an unterschiedliche Bedingungen erlaubt. Hauptsächlich ändert sich die gegenseitige Lage von Kern, Kinetoplast und Geißeln sowie die Zellform (6) (Tabelle 1).

Tab. 1. Nomenklatur und verschiedene Formen der Trypanosomatiden.

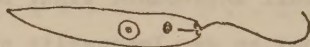
Amastigot, Sphäromastigot



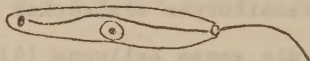
Choanomastigot



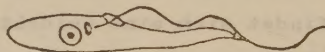
Promastigot



Opisthomastigot



Epimastigot



Trypomastigot



Crithidia fasciculata, ein bei Insekten vorkommendes Trypanosom, hat einen etwas eingeschränkten Polymorphismus im Vergleich zu anderen Trypanosomen. Die verschiedenen Formen von Epimastigot bis zu Sphäromastigot bilden sich in Kultur leicht. Damit bietet sich *Crithidia* als günstiges Modell zum Studium bestimmter trypanosomenspezifischer Eigenschaften an.

Der Schwerpunkt der physiologischen und pharmakologischen Arbeiten zur Bekämpfung pathogener Trypanosomen liegt augenblicklich hauptsächlich auf vier Gebieten.

- A - Immunologische Arbeiten, die einmal auf eine Schutzimpfung zielen, und zum anderen auf die Gewinnung von Antikörpern zur Diagnose der Krankheit (u.a. bei der Chagas-Krankheit (7)).
- B - Einwirkung verschiedener Drogen auf die DNA des Kinetoplasten (Newton (8)). Dabei wird der Differenzierungsprozeß gestört.
- C - Hemmung des für eine DNA-Synthese essentiellen Folat-Metabolismus. Dies kann auf verschiedene Art erreicht werden. Hauptmethode ist die Hemmung der Biosynthese des L-Dihydrofolats durch Sulfonamide (9) und die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase (10-12).
- D - Hemmung lebenswichtiger Transportsysteme, wie das der Folsäure (13, 14) und des Biopterins (15).

Mit dem für Biopterin verantwortlichen Transportsystem beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Biopterin ist ein in der Natur weit verbreitetes Pteridin (16). Bei *Crithidia fasciculata* ist es ein essentieller Wachstoffs (17). Bis jetzt ist seine Funktion als Kofaktor der Phenylalaninhydroxylase bekannt (18). Ferner wurde seine Funktion im zellulären Elektronentransport wahrscheinlich gemacht (19). *Crithidia* benötigt eine sehr geringe Biopterinkonzentration (10^{-11} bis 10^{-12} g/ml) für halbmaximales Wachstum und reichert das Pterin durch einen aktiven Transport an (20).

Wie ist ein Transportsystem beschaffen, welches bei solchen geringen Konzentrationen ökonomisch arbeitet? Zwei Möglichkeiten

bieten sich an:

- 1 - Biopterin wird durch einen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden und danach zu einem Carrier oder zu einer bestimmten Stelle der Zelloberfläche hingeführt, wo der Transport von außen nach innen erfolgt.
- 2 - Biopterin wird durch ein spezifisches oder viele unspezifische Carrier-Systeme in die Zelle hineintransportiert. Danach wird es entweder gezielt zu einem Kompartiment geleitet oder frei im Zellinnern verteilt.

Aus thermodynamischen Gründen arbeitet wegen des geringeren Energieaufwands ein System, das Biopterin aktiv zu einem Kompartiment führt, ökonomischer als ein Transportsystem, welches zuerst das Biopterin aktiv in die Zelle bringt und es danach sich ungerichtet verteilen läßt. Im letzteren Fall wird eine viel größere Biopterinmenge benötigt, um die selbe Funktion zu erfüllen, wie bei einem gezielten Transport. Ein Transport an der äußeren Membranoberfläche und im Zellinnern wurde bei vielen verschiedenen Zellen beobachtet, wobei die Mikrotubuli immer mitbeteiligt waren (21-26). Ein anderer wichtiger Aspekt, der berücksichtigt werden muß, ist der, daß mit zunehmender Bindungskapazität der Zelloberfläche auch die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß ein Biopterinmolekül in die Zelle hineinkommt. Eine hohe Bindungskapazität kann entweder durch eine große Zahl spezifischer Bindungsmöglichkeiten an der Zelloberfläche mit einer entsprechend geringen Ausnützung erreicht werden, oder durch eine unspezifische Bindung, die über die ganze Zelloberfläche verteilt ist. Es wurde deshalb untersucht, ob biopterinspezifische Rezeptoren oder Permeasen vorhanden sind. Dazu wurden die Zellen entweder osmotisch geschockt (27) oder mit Proteasen be-

handelt (28-31). Der osmotische Schock hat sich als eine sehr geeignete Technik zum Studium spezifisch bindender Proteine in Transportsystemen bewährt (32, 33). Mit dieser Methode ist es gelungen, beispielweise das spezifisch bindende Protein des Galactose-, Leucin-, oder Thiamintransports aus Bakterienmembranen zu isolieren und durch Zugabe des Proteins den Transport wieder zu restaurieren (34-37).

Mikrotubuli sind an der Chromosomenteilung (als Spindel), bei der Formbildung (Zytoskelett) und der Geißelbewegung beteiligt. Ihre Bedeutung bei Bewegungen der Zelloberfläche und des Zellinnern ist auch für die vorliegende Arbeit von großem Interesse. Ihre Struktur wird deshalb im folgenden kurz beschrieben. Die bei Eukaryonten weit verbreiteten subzellulären Komponenten haben eine zylinderförmige Gestalt. Ihr Durchmesser wird allgemein mit $240 \pm 20 \text{ \AA}^\circ$ (38) angegeben; es wurden aber auch andere Werte gefunden, die zwischen 180 und $340 \text{ \AA}^\circ$ liegen (39). Die innere Öffnung des Zylinders hat einen Durchmesser von $150 \text{ \AA}^\circ$. Forer und Bleche (40) führen die unterschiedlichen Meßergebnisse auf die verschiedenen Fixierungsmethoden zurück. Im allgemeinen bestehen die Mikrotubuli aus 13 Protofilamenten (41), die aus Tubulin 1 und 2 bestehen. Tubulin 1 hat ein Molekulargewicht von 56 000, Tubulin 2 von 53 000 (42). Diese Zusammensetzung haben alle Mikrotubuli der verschiedenen Spezies (43, 44), wobei Variationen sich auf die Aminosäurezusammensetzung und eine entsprechend unterschiedliche Wanderung in der Elektrophorese beschränken (42). Starke Unterschiede bestehen in der Stabilität der verschiedenen Mikrotubuli, die unter anderem auf folgenden Eigenschaften beruhen:

- 1 - Die verschiedenen Tubuline unterscheiden sich trotz großer Stabilitätsunterschiede in ihrer Struktur nur wenig (38).
- 2 - Die intermikrotubulären Bindungen werden durch eine Assoziation der Tubuline mit anderen Komponenten verursacht (45, 46).
- 3 - Die Mikrotubuli sind möglicherweise überhaupt keine homogenen Strukturen. Thomas und Henley (47, 48) nehmen an, daß die Assoziation der Tubulin-Untereinheiten in einem Mikrotubulus unterschiedlich sein kann.

Die Bewegung der Mikrotubuli kann einmal über einen Gleitmechanismus erfolgen (Geißelbewegung, 49-51) und zum anderem durch ein Ziehen und Drücken verursacht werden, das von der Polymerisation und Depolymerisation der Tubuline stammt (Chromosomentrennung, Spindel, 52). Die Strukturen können auch als Leitungsmechanismus für Substanzen und größere Komponenten dienen. Die Polymerisation der Mikrotubuli wird durch verschiedene Substanzen gehemmt, von denen Colchicin wegen seiner besonderen Bedeutung etwas näher betrachtet werden soll. Colchicin ist ein Alkaloid, das Tubulin dimer in einer 1:1 Stöchiometrie hydrophob bindet. Die Bindung erfolgt an einer ganz bestimmten Stelle des Tubulins und gilt für alle Tubuline (53-57). Colchicin verursacht keine Depolymerisation der Mikrotubuli, vielmehr wird das Gleichgewicht Mikrotubuli $\rightleftharpoons$ Tubulin von Colchicin zugunsten des Tubulins verschoben.

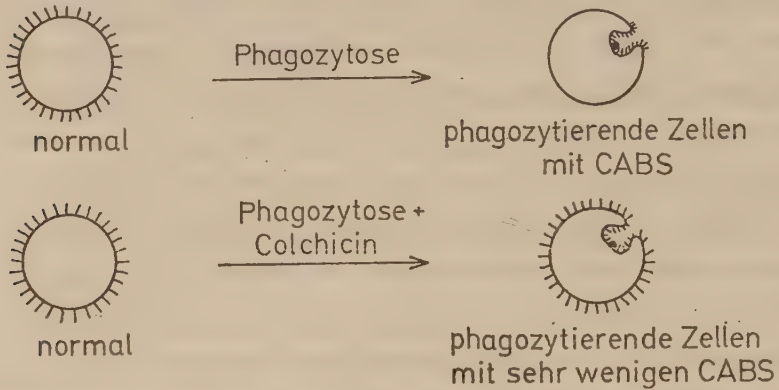
Singer und Nicholson (58, 59) haben gezeigt, daß sich Membranoberflächen aus einem fluiden und einem festen Teil zusammen-

setzen. Diese Strukturierung wurde auch von anderen Autoren beobachtet (60-64). Die Bewegung von Molekülen an der Membranoberfläche kann zu kleinen fleckigen Ansammlungen an verschiedenen Stellen (Patches), oder zu einer großen Kappe (Cap) an der Zelle führen (65). Petris und Raff (66) haben bei Lymphocyten gezeigt, daß sich solche Kappen nur in Gegenwart multivalenter Antikörper bilden. Monovalente Antikörper verursachen dagegen keine Kappe, weil keine Vernetzungsmöglichkeit besteht. An den Bewegungsvorgängen der Membranoberfläche scheinen Rezeptoren, Mikrofilamente und Mikrotubuli beteiligt zu sein (65,67). Drei Beobachtungen sollen die Vielfältigkeit und Komplexität dieser Bewegungsvorgänge veranschaulichen und eine Aussage über denkbare Mechanismen ermöglichen. Ein ausführlicher Überblick ist in der Zusammenfassung von Nicholsons zu finden (68).

1. Lymphocyten bilden in Gegenwart von Concanavalin A Flecken auf der Zelloberfläche. Zugabe von Colchicin führt zu einer größeren Frequenz der Kappenbildung (67) und von Cytochalasin B zur Auflösung der Kappen, und dies mit unterschiedlichen Intensitäten (68). Versuche mit Mutanten von gegen Colchicin resistenten Hamsterzelllinien haben gezeigt (69,70), daß die Ausbildung von Kappen von Colchicin abhängig ist (71). Albertini und Clark (72) konnten mit fluoresceinmarkiertem Colchicin elektronenmikroskopisch nachweisen, daß bei durch Concanavalin A induzierter Kappenbildung die zytoplasmatischen Mikrotubuli sich an einer Stelle anhäufen.

2. Kaninchenzellen des PMN-Stamms verringern die Zahl ihrer Conca-

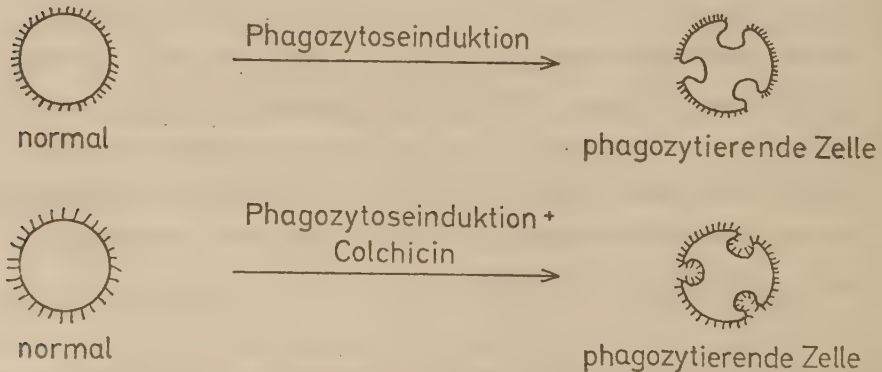
navalin-A-Bindungs-Stellen (CABS) bei induzierter Phagozytose (21). Colchicin verhindert die Bewegung der CABS zum Ort der Phagozytose. Es greift also in dem Transport der CABS auf der Zelloberfläche ein (73).



3. Tsan und Berlin (74), Ukena und Berlin (75) haben beim Adenosin- und Lysintransport mit Kaninchen-PMN-Zellen folgendes beobachtet:

Experiment	Lysin- und Adenosintransport
1. PMN (Kontrolle)	100 %
2. PMN + Phagozytoseinduktion	100 %
3. PMN + Phagozytoseinduktion + Colchicin	60 %

Mikrotubuli haben demnach eine Koordinationsfunktion bei der Verteilung der Carrier an der Membranoberfläche.



Wichtig für unsere Betrachtung ist, daß ähnliche Phänomene auch bei verschiedenen Einzellern beobachtet worden sind. So zeigt *Entamoeba histolytica* das Kappephänomen nach Behandlung mit Concanavalin A (76). Die Membranoberfläche von *Tetrahymena* wird durch Colchicin oder Kälte stark beeinflusst (77, 78). *Leishmania tropica enriettii* zeigt nach Behandlung mit Antikörpern ein Kappephänomen und eine darauffolgende Pinozytose (79). *Crithidia fasciculata* (80), *Trypanosoma rhodesiense* (81) und *Trypanosoma brucei* (82) transportieren markierte Proteine zur Geißeltasche. *Trypanosoma rave* transportiert Ferritin-markierte Proteine zum Cytopharynx (83). *Trypanosoma cruzi* (84) bildet mit Concanavalin A eine Kappe aus, die durch die Geißeltasche von der Zelle aufgenommen wird.

Ausgehend von der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Hemmung des Biopterintransports durch Colchicin, der Anwesenheit von Mikrotubuli an der zytoplasmatischen Membran (85, 86) und der Bewegung von Ferritin-markierten Proteinen zur Geißeltasche (80) soll untersucht werden, ob der Biopterintransport von der Membranoberfläche oder einer internen Bewegung in der Zelle beeinflusst wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen Rezeptoren, Permeasen und Mikrotubuli beim Biopterintransport zu suchen. Solche Untersuchungen schließen Beobachtungen über den Polymorphismus von *Crithidia* ein, um über eine Kontrolle verschiedener Parameter eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten.

MATERIAL UND METHODEN

1. Crithidia-Züchtung

Zur Gewinnung größerer Crithidiamengen (10^9 bis 10^{10} Zellen) wurde das von Guttman (87) beschriebene Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Saccharose	30 g
Hefeextrakt (Difco)	15 g
Pepton aus Casein (E. Merck)	15 g
Häminchlorid (Carl Roth) (500 mg Hämin in 50 ml Wasser und 40 ml Triäthanolamin)	15 ml
Leberextrakt (Difco)	75 mg

Nach Auffüllen auf 3 Liter wird das Medium auf pH 7. 8 eingestellt. 500 ml dieser Lösung wurden in 1. 9 Liter Fernbachflaschen verteilt, 20 Min. lang bei 1 kg/cm^2 autoklaviert und anschließend mit 10^7 Crithidiazellen (ATCC-Stamm 12857) beimpft.

2. Ernten der Crithidiazellen

Die auf 10^7 Zellen/ml gewachsene Kultur wird 20 Min. lang bei $2\,000 \times g$ (MSE) zentrifugiert, der Niederschlag 2 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen und dann 5 Minuten lang bei $2\,000 \times g$ zentrifugiert (Christ, Minifuge). Alle Operationen werden bei 0°C durchgeführt.

3. Bestimmung der Zellkonzentration

Es wurde eine Zählkammer (Neubauer-Kamera, Zeiss) benützt. Gelegentlich wurde auch die Absorption bei 650 nm (Zeiss PMQ II) bestimmt.

4. Proteinbestimmung

Sie wurde nach Lowry (88) durchgeführt. Die UV-Absorption wurde bei 750 nm mit einem Zeiss PMQ II gemessen.

5. Bestimmung des cytosolischen pH-Werts

Die gewaschenen Zellen wurden in ein kleines graduiertes Gefäß überführt und mit Wasser auf 2 ml Volumen aufgefüllt. Die Verdünnung soll nicht höher als 1:2 sein. Die Lösung wurde mit Ultraschall (Branson Sonic Power Co., Sonifier B-12, Leistung 100 W) solange behandelt, bis im Mikroskop keine intakten Zellen mehr zu sehen waren. Danach wurde der pH mit der Elektrode (Radiometer Kopenhagen) gemessen. Die ganze Operation wurde bei 0 °C durchgeführt.

6. Sauerstoff-Bestimmung

Zwischen 10^5 bis 10^7 Crithidiazellen/ml gleicher Konzentration wie im Zuchtmedium werden in 5 ml frischem Zuchtmedium mit einer Klark'schen Sauerstoffelektrode polarographisch (89) gemessen. Dazu wurde das Gerät der Firma L. Eschweiler und Co. verwendet.

7. Invertase(β -D-Fructofuranosidase, EC 3.2.1.24.)-Bestimmung

Es wird die Änderung des Glucose-und Fructosespiegels im Medium

bestimmt. Glucose und Fructose wurden folgendermaßen gemessen (Anlehnung an (90)):

Reaktionslösungen:

Puffer (9,3 g Triäthanolamin/Liter in H_2O , mit 1 M HCl auf pH 7,6 eingestellt)	2.65 ml
$MgCl_2$, 0,1 M	0.1 ml
ATP, 1%	0.1 ml
NADP, 1%	0.1 ml
Hexokinase (1 mg Protein/ml; Stammlösung mit 3 M Amoniumsulfatlösung verdünnt)	0.01 ml
Probe	0.02 ml

Die Extinktionsänderung wird bei 366 oder 340 nm im Zeiss PMQ II gemessen (E_1). Anschließend wird die Reaktion mit

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Stamm- lösung mit 3,2 M Amoniumsulfat auf 1 mg Protein/ml verdünnen)	0.01 ml
--	---------

gestartet. Nach gutem Mischen wird nach 10, 12, 14 und 16 Minuten die Extinktion abgelesen und auf 0 Minuten extrapoliert (E_2). Zuletzt werden

Phosphoglucose-Isomerase (Stammlösung mit 2,4 M Ammoniumsulfatlösung auf 1 mg Protein/ml verdünnen)	0.01 ml
---	---------

zugemischt und es wird E_3 bestimmt. Die Glucose- und Fructosewerte wurden wie folgt berechnet:

Extinktion bei Glucose: $E_2 - E_1$,

Extinktion bei Fructose: $E_3 - E_2$,

Verechnung bei 366 nm:

$$\text{mg/ml} \frac{\text{Glucose}}{\text{Fructose}} = \frac{\text{Extinktion} \frac{\text{Glucose}}{\text{Fructose}} \times 3 \text{ ml L\"os.} \times \text{Verd.} \times \frac{\text{Mol.}}{\text{Gew.}}}{3,3 \text{ (Extinktionskoeffizient)}}$$

Die Berechnung mit 340 nm ist gleich der mit 366 nm, nur mit dem Unterschied, daß der Extinktionskoeffizient 6,22 ist.

8. Messung der Inkorporation markierter Isotope in Crithidia

Die Crithidiazellen werden wie bereits beschrieben gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6 suspendiert. Es wurden folgende isotonenmarkierte Verbindungen benützt:

- (2-¹⁴C)Biopterin, 6 mCi/mMol (91)
- (2-¹⁴C)Biopterin, 46 mCi/mMol (91)
- (8-¹⁴C)Guanosin, 17 mCi/mMol, Amersham
- (8-¹⁴C)Guanin, 55 mCi/mMol, Amersham
- (2-³H)Adenosin, 17 Ci/mMol, Amersham
- (5,6-³H)Uridin, 26 Ci/mMol, Amersham
- (2-¹⁴C)Thymidin, 54 mCi/mMol, Amersham
- (U-¹⁴C)L-Valin, 10 mCi/mMol, Amersham
- (U-³H)L-Prolin, 500 mCi/mMol, Amersham
- (U-¹⁴C)D-Fructose-1,6-diphosphat, 69 mCi/mMol, Amersham
- (U-¹⁴C)D-Glucose, 250 mCi/mMol, Amersham
- (Ring C-methoxyl-³H)Colchicin, 10 mCi/mMol, Amersham

Nach der Inkubation mit unterschiedlichen Zeiten bei 25°C wurden die Proben auf 0 °C abgekühlt, bei 0-3 °C zentrifugiert

(Christ Minifuge, 2 000 x g) und 2 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen. Die Proben wurden anschließend in Verbrennungsgefäße (Combustocoones mit Combustopads, Packard Instr. Co.) überführt, getrocknet und im Oxidizer 306 (Packard Instr. Co.) verbrannt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Packard 3 380 mit Automatik 544) gezählt.

9. Erzeugung von Antikörpern

Als Antigen wurden 4 Tage alte Crithidia-Kulturen verwendet, die 3 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen waren. Eine Suspension dieser Zellen (10^8 /ml) wurde mit 6 ml komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert. Pro Kaninchen wurden 2 ml der Emulsion an multiplen Stellen intradermal injiziert. 10 Tage nach der Erstinjektion und anschließend in Abständen von einem Monat erhielten die Tiere das selbe Antigengemisch als Boosterinjektion. Die erste Blutabnahme aus der Ohrvene erfolgte zwei Monate nach der Erstinjektion. Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut eine Stunde bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen des Blutkuchens wurden die restlichen Erythrocyten abzentrifugiert und das Serum bei -20 °C gelagert.

10. Aggregationsfähigkeit der Crithidiazellen

Die Aggregation wurde mit einem Leitz-Mikroskop bei 540facher Vergrößerung beobachtet. Die Crithidiazellen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, mit verschiedenen Serumkonzentrationen versetzt und die Hemmkonzentration bei 50% Aggregation bestimmt.

11. Osmotischer Schock der Crithidiazellen

Entsprechend dem von Heppel (27) beschriebenen Verfahren wurden gewaschene Crithidiazellen (5×10^8 Zellen/ml) in einer Lösung von 0,5 M Saccharose in 0,1 M Tris(Hydroxymethyl)aminomethan-Puffer und dann 1 mal in 10^{-4} M EDTA 10 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 5×10^{-4} M MgCl_2 -Lösung aufgenommen.

ERGEBNISSE

1. Morphologische und physiologische Veränderungen der Crithidiazellen bei Entwicklung in Kulturflüssigkeit

Während ihrer logarithmischen Wachstumsphase hat die Crithidiazelle eine längliche Form, die im Verlauf der weiteren Entwicklung über Zwischenformen in eine rundliche übergeht. Im Gegensatz zu Zellen mit länglicher besitzen solche mit runder Form bei Trypanosomatiden nur noch eine sehr kurze Geißel. In Tabelle 2 sind die Differenzierungsstadien von *Crithidia fasciculata* zusammengestellt.

Tab. 2. Differenzierungsstadien von *Crithidia fasciculata* (6).
(vgl. dazu Tab. 1)

Form	Bezeichnung
länglich	Epimastigot
oval	Choanomastigot
rund	Sphäromastigot

Die gleichen Formen werden mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften auch in der Natur gefunden. Bei *Anopheles gambiae* findet man im Enddarm die epimastigote Form sowohl freischwimmend (Nectomonaden) als auch an der Darmwand angeheftet (Haptomonaden). Die Sphäromastigote kommen aber nur im Lumen des Darms vor (92). *Crithidia* kann sich auch im Wasser halten, von wo aus sie oft übertragen wird (93).

1.1 Einfluß der Wachstumsdauer auf die Differenzierung

In Abbildung 1 ist der Einfluß der Wachstumsdauer auf die Zellform von *Crithidia* dargestellt. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, also mit Erreichen eines Plateaus, wandelt sich die längliche innerhalb eines Tages in die runde *Crithidia*form um. Offensichtlich sind also Wachstumsaktivität und äußere Form eng miteinander gekoppelt.

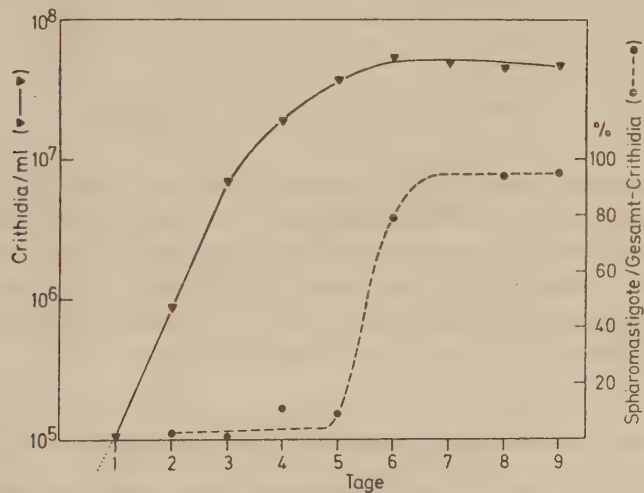


Abb. 1. Zeitabhängige Änderung der äußeren Form von *Crithidia fasciculata* bei Züchtung in Kulturmedium. Kulturbedingungen: 500 ml Kulturmedium (nähere Beschreibung siehe Material und Methoden) in 1.900 ml Fernbachflasche; Temperatur 25°C. ▼ — ▼: Anzahl *Crithidia*-Zellen/ml Kulturmedium, • - - - • Anteil Sphäromastigote an Gesamtzellzahl.

Dies zeigt sich auch im Proteingehalt der Zelle (Abb. 2).

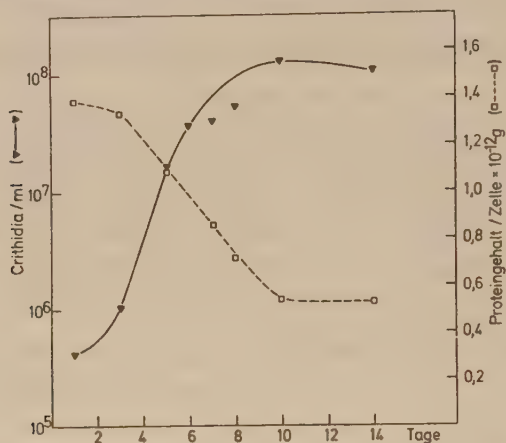


Abb. 2. Proteingehalt der Crithidia bestimmt nach Lowry (88), in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer. Die Zellen wurden einer entsprechend Abb. 1 angesetzten Kultur entnommen und 2 mal mit dem Ausgangsvolumen 0,1M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen (Einzelheiten siehe Material und Methoden). ▽ — ▽ : Anzahl Crithidia-Zellen/ml Kulturmedium, □ - - □ : Proteingehalt/Zelle.

Schon während des logarithmischen Wachstums nimmt der mittlere Proteingehalt der einzelnen Zelle stetig ab und erreicht einen konstant niedrigen Wert, wenn die Kultur ausgewachsen ist. Dort findet man dann auch nur noch die runde Form der Crithidiazelle.

1.2 Einfluß des pH-Werts auf die Differenzierung

Offenbar besteht ein enger Zusammenhang zwischen Crithidia-

Wachstum und pH-Wert der Kulturlösung (Abb. 3). Die im experimentellen Teil beschriebene Methode zur Bestimmung des Cytosol-pH-Wertes ist gut reproduzierbar mit einem Variationskoeffizienten von weniger als 1,5%. Parallel zum Wachstum der Zellen sinkt der pH-Wert des Mediums von ursprünglich 7,8 auf 4,6 in der stationären Phase ab. Auch im Zellinnern kommt

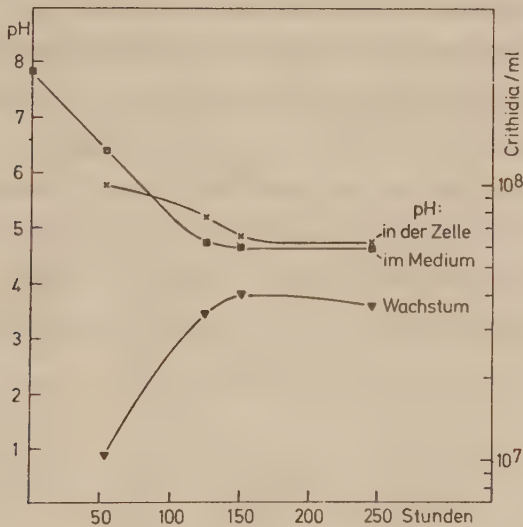


Abb. 3. Änderung des pH-Wertes von Cytosol und Kulturmedium im Laufe der Crithidia-Entwicklung. Bedingungen wie in Abb. 1 und 2. ▼—▼: Anzahl Crithidia-Zellen/ml Kulturmedium, ■ — ■: pH im Kulturmedium, × — ×: pH im Cytosol.

es zu einer pH-Änderung, wenn auch deutlich langsamer, was zu einer Überkreuzung der beiden Kurven in Abb. 3 führt. Diese Befunde deuten auf eine Veränderung der Membranpolarisation

hin, die wahrscheinlich auch einen Einfluß auf die Membranpermeabilität hat. Später beschriebene Versuche zeigen in der Tat eine Änderung der Permeabilität beim Biopterintransport und auch bei der Anfärbung mit Acridinorange.

1.3 Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die Atmung

Die Atmung von *Crithidia fasciculata* ändert sich im Verlauf der Differenzierung. Aus einer *Crithidia*-Kultur wurden zu verschiedenen Zeiten Zellen entnommen und in frischem Kulturmedium suspendiert, so daß die *Crithidia*-Konzentration im neuen Medium gleich blieb. Zur Belüftung wurde 30 Sekunden lang intensiv geschüttelt und dann die Atmung polarographisch verfolgt. Innerhalb der Meßdauer verläuft sie linear, solange Sauerstoff vorhanden ist. Das in Abb. 4 dargestellte Ergebnis

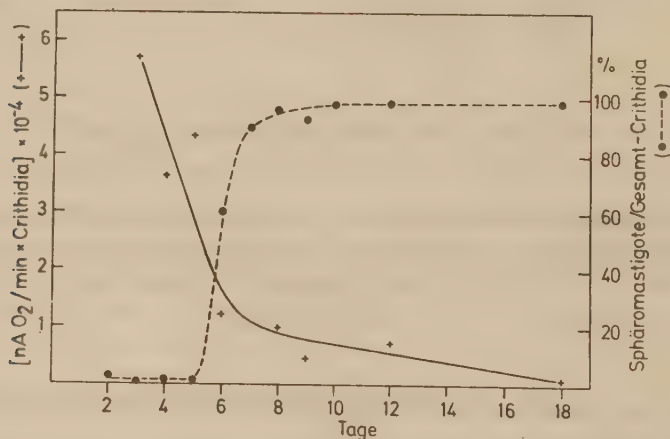


Abb. 4. Atmungsintensität ($\text{nA O}_2/\text{min} \times \text{Zelle}$) von *Crithidia* zwischen 10^5 und 5×10^7 Zellen/ml im Kulturmedium, in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand. Einzelheiten siehe Material und Methoden. ● - - ● : Anteil Sphæromastigote an Gesamtzellzahl, + — + : Atmungsintensität.

zeigt klar, daß die Atmung stark zurückgeht, wenn mit Erreichen der stationären Phase nur noch die runde Form des Sphäromastigots vorliegt.

1.4 Invertase-Aktivität bei *Crithidia fasciculata*

Der Glucose- und Fructosegehalt des Kulturmediums steigt etwa 2 Tage nach Beimpfen mit *Crithidia* steil an und geht dann mit dem weiteren Wachstum der Kultur wieder zurück (Abb. 5). Da

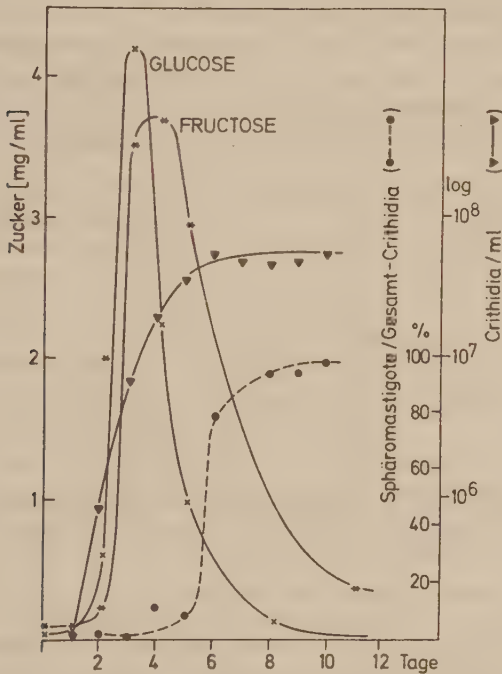


Abb. 5. Glucose- und Fructosekonzentration im Kulturmedium einer wachsenden *Crithidia*-Kultur. Die Bedingungen waren gleich wie in Abb. 1. ▼ — ▼ : Anzahl *Crithidia*-Zellen/ml Kulturmedium, ● - - - ● : Anteil Sphäromastigote an Gesamtzellzahl, x — x: D-Glucose, x — x: D-Fructose.

das Kulturmedium nur Saccharose enthält, muß diese enzymatisch gespalten worden sein. Die Werte in Tabelle 3 zeigen, daß im Kulturmedium nur eine geringe Invertase-Aktivität nachweisbar ist. Das Enzym wird also nicht von den Zellen ins Medium abgegeben. Die Enzym-Aktivität des Kulturmediums lag unter den Versuchsbedingungen nur bei etwa 2% des Wertes von 5×10^8 Crithidiazellen/ml.

Tab. 3. Prüfung von Crithidiazellen und Medium auf Invertase-Aktivität. Einer wachsenden Kultur von $2,3 \times 10^7$ Zellen/ml wurden 2 Proben entnommen, zentrifugiert und 1 Stunde in frischem Kulturmedium bei 25°C und mit 5×10^8 Zellen/ml Endkonzentration inkubiert. Danach wurde die eine Probe zentrifugiert und ohne Crithidia eine weitere Stunde lang inkubiert. Die zweite Probe wurde die gleiche Zeit ohne Behandlung weiter inkubiert.

Nachinkubation	Zunahme Invertzucker (mg/ml)
mit Crithidia	6,24
ohne Crithidia	0,12

Auch nach der Methode von Heppel (27) geben osmotisch geschockte Zellen keine wesentliche Enzymaktivität in den Überstand ab (Erhöhung von 2 auf 4%). Weinberg und Orton (94) haben Invertase bei *Saccharomyces mellis* mit 0,5M Kaliumchlorid extrahiert. Demis, Rothstein und Maier (95) zeigten, daß bei Hefe das Enzym an der Membranoberfläche vorkommt und andere Autoren (Gacón, Neuman und Lampen, (96)) stellten fest, daß auch eine interne Invertase existiert, die sich vom Membranenzym unterscheidet. Bei *Crithidia oncopelti* wurde Invertase

in Lysosomen gefunden (97). Es wurden deshalb verschiedene auf Membranoberflächen wirkende Substanzen geprüft. Nach Tabelle 4 beeinflußt keine von ihnen die Aktivität von Invertase.

Tab. 4. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Invertase-Aktivität von *Crithidia fasciculata*. Kulturmedium mit 5×10^8 Zellen/ml.

Zusatz	Invertzucker (mg/ml)
Kontrolle	8,8
Colchicin, 5mM	7,4
Concanavalin A, 1,5 µg/ml	7,9
Kaninchen-Antiserum No. 31	6,2
" " No. 32	5,5
" " No. 33	5,4

Die Invertase-Aktivität ist bei der länglichen und der runden *Crithidia*-Zelle gleich hoch, wie Tabelle 5 zeigt.

Tab. 5. Invertase-Aktivität in den beiden Formen von *Crithidia fasciculata*. Inkubation von 5×10^8 Zellen/ml in Kulturmedium bei 25°C.

Form	Invertzucker (mg/ml)
längliche <i>Crithidia</i>	2,7
runde <i>Crithidia</i>	2,1

2. Hemmung des Biopterintransports durch Colchicin

Wie in der Einleitung diskutiert, besteht die Möglichkeit, daß Mikrotubuli am Biopterintransport beteiligt sind. Folgende Eigenschaften werden allgemein zur Beschreibung der Mikrotubuli-Funktion herangezogen:

1. Ihre Polymerisation wird durch Colchicin und Podophyllo-toxin gehemmt (54, 98, 99).
2. Ihre Funktion wird von Lumicolchicin nicht beeinflusst (100).
3. Vinca-Alkaloide (Vincristin, Vinblastin) bilden mit Mikrotubuli Kristalle (101).

2.1 Einfluß von Colchicin, Lumicolchicin und Vincristin

In Abb. 6 ist die Wirkung der aufgeführten Hemmstoffe auf den Biopterintransport bei *Crithidia fasciculata* dargestellt. Das Ergebnis zeigt, daß Vincristin überhaupt keinen Einfluß hat, während Colchicin und Lumicolchicin eine starke Hemmung hervorrufen. Dies steht nicht in Einklang mit den beschriebenen Wirkungen auf die Mikrotubuli. Obwohl Colchicin stark hemmt, erscheint es wenig wahrscheinlich, daß diese Zellorganellen am Biopterintransport beteiligt sind, da Vincristin und Lumicolchicin sich geradezu entgegengesetzt verhalten. Die in Abb. 7 dargestellte Versuchsserie zeigt klar, daß die Colchicinwirkung auf den Biopterintransport nicht durch eine Depolymerisation der Mikrotubuli zu erklären ist.

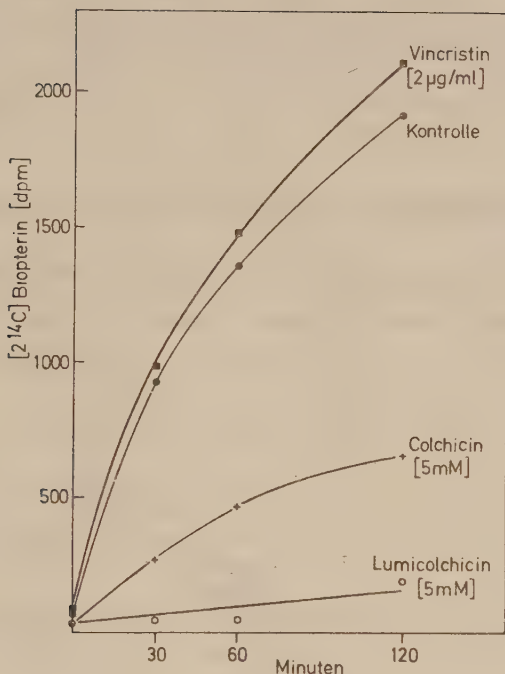


Abb. 6. Einfluß von Vincristin, 2 µg/ml (■ — ■), Colchicin, 5 mM (+ — +) und Lumicolchicin, 5 mM (o — o), auf den Einbau von (2-¹⁴C)-Biotin in *Crithidia fasciculata* im Vergleich zur Kontrolle (● — ●). Die Inkubation erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, mit 0,34 µg/ml (2-¹⁴C)-Biotin (6 mCi/mMol), bei 25°C. Jede Probe enthielt $2,5 \times 10^8$ Zellen und wurde nach der Inkubation 2 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen und dann verbrannt (Einzelheiten siehe Material und Methoden).

Bei 0,1 ng/ml Bioterinkonzentration ist das Wachstum mit Colchicin gleich dem der Kontrolle. Die sehr hohe Colchicinkonzentration von 5 mM verzögert bei einer Bioterinkonzentration von 0,02 ng/ml das *Crithidia*-Wachstum, ohne aber das Erreichen eines Plateaus zu verhindern. Erst bei noch weiterer Erniedri-

gung des Biopterinspiegels auf 0,006 ng/ml wird auch das Plateau der Kontrolle nicht mehr erreicht.

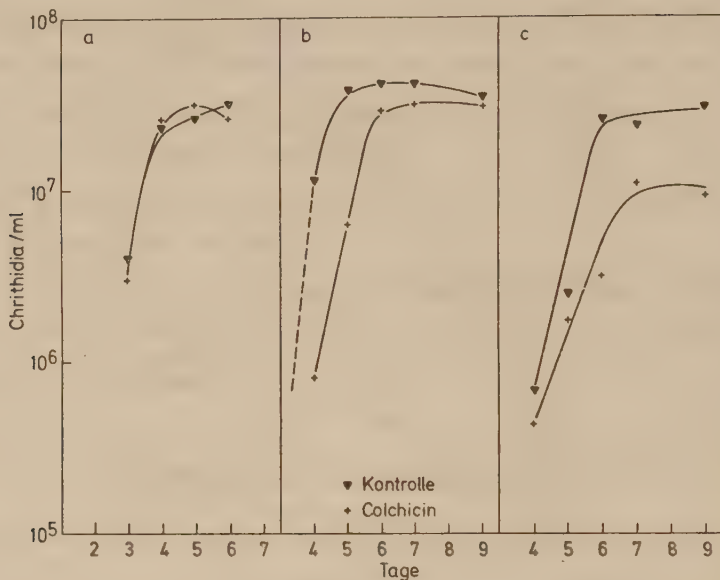


Abb. 7. Einfluß von 5 mM Colchicin (+ — +) auf die Wachstumswirkung von Biopterin im Vergleich zur Kontrolle (▼ — ▼). Biopterinkonzentrationen: Abb. 7a. 0,1 ng/ml, Abb. 7b. 0,02 ng/ml, Abb. 7c. 0,006 ng/ml. Aufzucht in 25 ml-Fernbachflaschen mit 5 ml Dry-Mix-Medium, bei 25°C.

Becker (102) konnte zwar zeigen, daß in vitro im Falle von Ratengehirn die Polymerisation der Mikrotubuli an der cytoplasmatischen Membran durch Colchicin nicht gehemmt wird. Im Hinblick auf das fast ungehinderte Wachstum der Crithidia-Kulturen erscheint es aber wahrscheinlicher, daß Colchicin an der Außenseite der Membran angreift. Dafür sprechen auch Befunde von Wilson (103) und von Cheng und Katsoyanis (104), die im Falle

des Nucleosid- und Glucose-Transports bei Säugerzellen die Colchicin- und Lumicolchicinhemmung an der Cytoplasmamembran nachweisen.

2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Colchicinhemmung

Der Einfluß der Hemmstoffmenge zeigt klar, daß der Biopterintransport erst bei relativ hohen Konzentrationen von 5-10 mM stark gehemmt wird (Abb. 8).

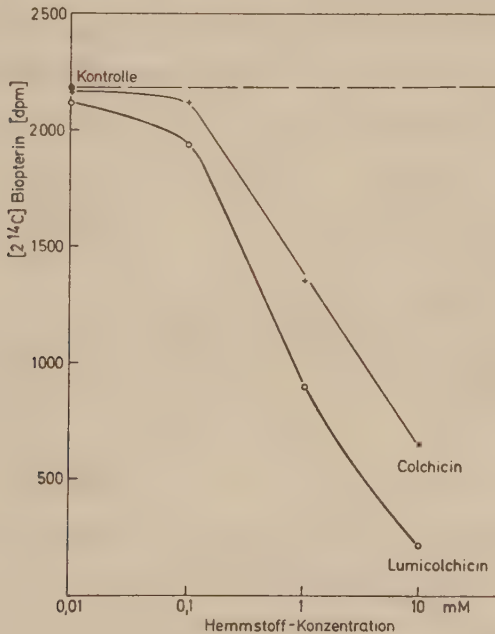


Abb. 8. Einfluß der Konzentration von Colchicin (+ — +) bzw. Lumicolchicin (o — o) auf den Einbau von (2-¹⁴C)Biopterin (0,34 µg/ml, 6 mCi/mMol) in *Crithidia fasciculata*. Kontrolle (— —). Inkubation in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, 2 Stunden bei 25°C. Jede Probe enthielt $2,5 \times 10^8$ Zellen.

Die Hemstoffmenge liegt damit wesentlich höher als die Konzentration von 10^{-5} M (105), bei welcher das System der Mikrotubuli beeinflußt wird. In den Arbeiten von Cheng und Katsoyanis (104) und von Mizel und Wilson (103) werden relativ hohe Colchicinkonzentrationen benötigt.

2.3 Art der Colchicinhemmung

Zur Klärung der Frage, ob Colchicin und Lumicolchicin den Biopterintransport kompetitiv oder nicht kompetitiv hemmen, wurde mit verschiedenen Biopterinkonzentrationen in Gegenwart von konstant 5 bzw. 0,1 mM Colchicin und 0,1 mM Lumicolchicin inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 und 10 nach Lineweaver

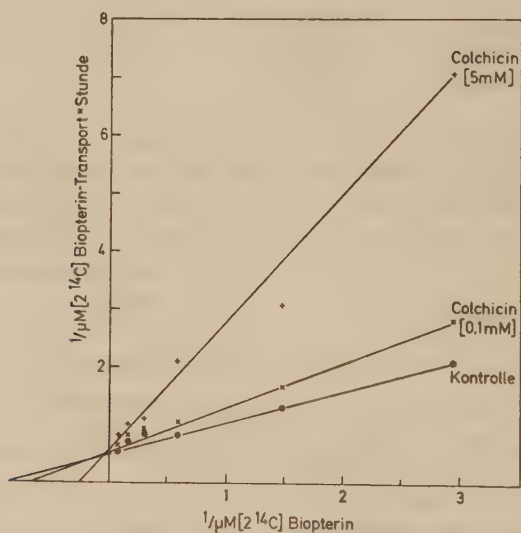


Abb. 9. Lineweaver-Burk-Diagramm zum Nachweis einer kompetitiven Hemmung des Biopterineinbaus in *Crithidia fasciculata* durch 5 mM (+ — +) bzw. 0,1 mM (x — x) Colchicin im Vergleich zur Kontrolle (● — ●). Inkubation 2 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, und jeweils mit $2,5 \times 10^8$ Zellen/Probe.

und Burk dargestellt. Sie zeigen, daß Colchicin den Biopterineinbau kompetitiv, Lumicolchicin nicht kompetitiv hemmt. Eine kompetitive Hemmung durch Colchicin wird auch für den Nucleosidtransport von Mizel und Wilson beschrieben (103).

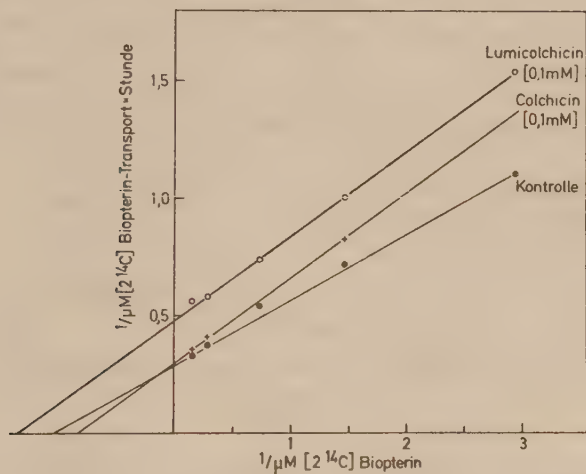


Abb. 10. Lineweaver-Burk-Diagramm zum Nachweis einer nicht kompetitiven Hemmung des Biopterintransports durch 0,1 mM Lumicolchicin (o — o) in *Crithidia fasciculata*. Alle Bedingungen wie für Abb. 9. Zum Vergleich 0,1 mM Colchicin (+ — +) und Kontrolle ohne Hemmstoff (• — •).

Wachstumsversuche mit Biopterinkonzentrationen zwischen 0,003 ng/ml ($1,2 \times 10^{-5} \mu\text{M}$) und 0,02 ng/ml ($8,4 \times 10^{-5} \mu\text{M}$) in 5 mM Colchicin bestätigen die kompetitive Hemmung (Abb. 11).

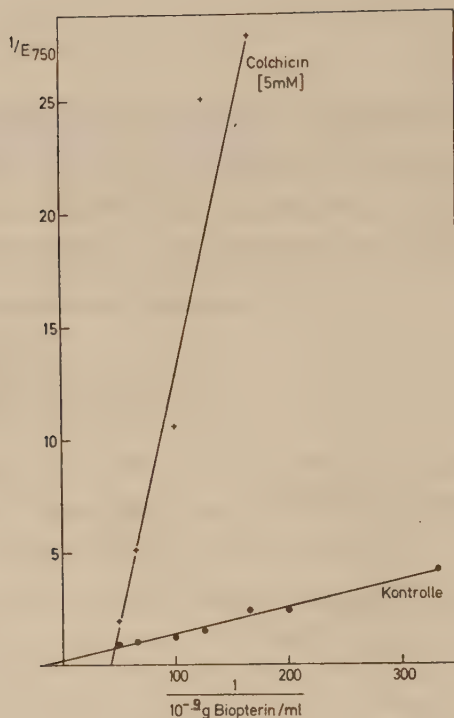


Abb. 11. Hemmung des Crithidia-Wachstums durch Colchicin (+ — +) im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoff (• — •), nach Lineweaver-Burk aufgezeichnet. Crithidia in Dry-Mix-Medium bei verschiedenen Biopterinkonzentrationen und bei 25°C gezüchtet. Colchicinkonzentration konstant 5 mM.

2.4 Biopterinabfluß

Die Transportrate eines Systems wird ausgedrückt durch die Steigung der Einbaukurve im Nullpunkt. Man muß deshalb die Einbauwerte zu Beginn der Messung in kurzen Zeitabständen verfolgen. Im Falle des Biopterintransports liegen die

Anfangswerte sehr niedrig und sind deshalb mit einem entsprechend hohen systematischen Fehler behaftet. Abbildung 12 zeigt aber, daß das von *Crithidia* aufgenommene Biopterin bei langer Inkubation der Zellen in biopterinfreiem Medium nur in geringer Menge abfließt. Daraus ergibt sich, daß der Abfluß innerhalb von 2 Stunden keinen großen Einfluß auf die Biopterinaufnahme hat.

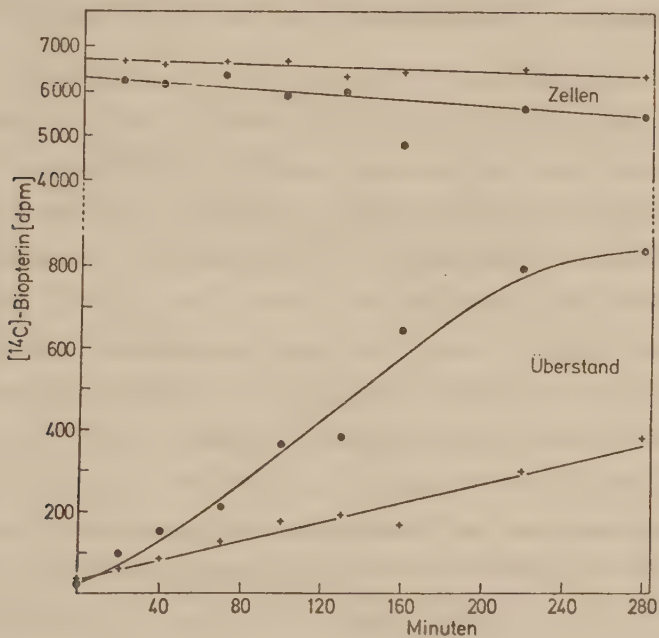


Abb. 12. Abgabe von Radioaktivität aus mit ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterin ($1,7\text{ }\mu\text{g/ml}$, 46 mCi/mMol) präinkubierten *Crithidia*zellen. Die gewaschenen Zellen wurden in $0,1\text{ M}$ Phosphatpuffer, pH 6, bei 25°C suspendiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden $0,5\text{ ml}$ entnommen und die Radioaktivität im Niederschlag (oben) bzw. im Überstand (unten) bestimmt. Kontrolle: ● —●, 5 mM Colchicin: + —+.

Colchicin hemmt aber auch den Biopterinabfluß und die Colchicinhemmung des Biopterintransports ist deshalb größer als den gemessenen Werten entspricht (siehe die für den Überstand erstellten Kurven).

2.5 Abhängigkeit des durch Colchicin gehemmten Biopterintransports vom Entwicklungszustand der Crithidia-Entwicklung

Es ist wahrscheinlich, daß sich mit der Umwandlung der Crithidia von der länglichen Epimastigot-Form in die des runden Sphaeromastigots auch die Membraneigenschaften ändern. Aus einer wachsenden Kultur wurden täglich Organismen entnommen und auf ihre Fähigkeit untersucht, $(2-^{14}\text{C})$ Biopterin in Gegenwart oder Abwesenheit von Colchicin aufzunehmen. Die in Abb. 13 zusammengefaßten Daten zeigen die starke Abhängigkeit des Biopterineinbaus vom Entwicklungszustand des Flagellaten. Mit dem Abklingen des Teilungswachstums der Kultur nimmt die Biopterinaufnahme stetig ab und hat bei einer 8-tägigen Zellsuspension nur noch etwa ein Zehntel des Wertes 3-tägiger Zellen. Die offenbare Änderung der Membraneigenschaften wirkt sich auf die Colchicinhemmung nicht aus, wie ein Vergleich mit der Kontrolle in Abb. 13 zeigt.

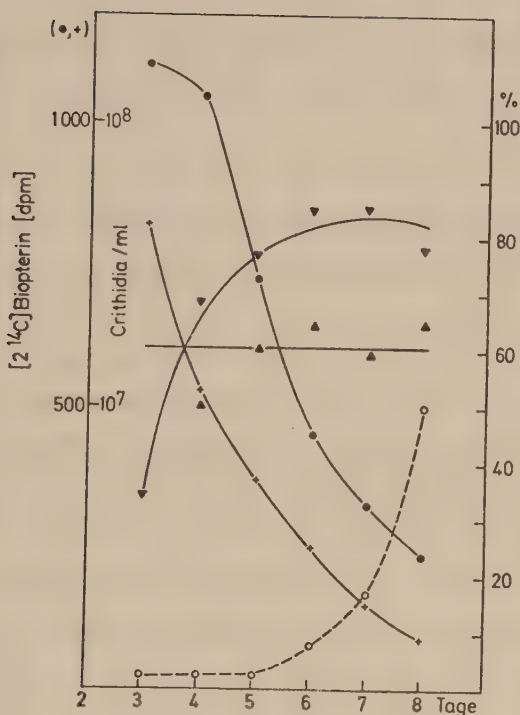


Abb. 13. Einfluß des Entwicklungszustands von *Crithidia fasciculata* auf den Biotpterineinbau und seine Hemmung durch Colchicin. Einer wachsenden Kultur (ein 500 ml Kultur-Medium in 1 900 ml Fernbachflasche wurde wie üblich mit 10^5 Zellen beimpft und bei 25°C inkubiert) wurden in Abständen von einem Tag Zellen entnommen, wie üblich gewaschen und in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, suspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 25°C wurden die Proben 2 mal gewaschen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Probe). Inkubation in Gegenwart von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biotpterin ($0,24 \mu\text{g/ml}$, 6 mCi/mMol) ohne Colchicin (● — ●) und mit 5 mM Colchicin (+ — +). Prozentuale Hemmwirkung (▲ — ▲). Anteil der Sphäromastigote (o - - - o). *Crithidia* Wachstumskurve (▼ — ▼) in Anzahl Zellen/ml Kulturmedium.

Eine im Laufe der Crithidia-Entwicklung erfolgende Änderung der Permeabilität zeigt auch die Fluoreszenzfärbung der Zellen mit Acridinorange. Epimastigote Crithidiazellen werden von Acridinorange nicht, sphäromastigote dagegen orange angefärbt.

Veränderungen an der Membranoberfläche können auch aus der Aggregation der Crithidiazellen bei Zugabe von Antikörpern erschlossen werden. Eine solche Aggregationsfähigkeit wurde bei Crithidia (106) und anderen Flagellaten beobachtet, hauptsächlich als Folge einer Vernetzung zwischen den Geißeln. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde auch eine Anheftung an der Glasoberfläche beobachtet. Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation wurde mit Epimastigoten und Sphäromastigoten unter Verwendung verschiedener Kaninchen-Antiseren untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Bei allen Seren werden wesentlich höhere Mengen zur Aggregation der Sphäromastigote benötigt. Das Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Membranoberfläche sich im Laufe der Differenzierung vom Epimastigot zur Sphäromastigot verändert. Colchicin und Concanavalin A haben weder selbst die Fähigkeit, Crithidiazellen zu aggregieren, noch haben sie einen Einfluß auf die von den Seren hervorgerufene Aggregation.

Tab. 6. Konzentrationsabhängigkeit der Immunpräzipitation verschiedener Crithidiastadien durch Kaninchen-Antiseren. Es wurden 10^8 Zellen/ml in 0,1M Phosphatpuffer, pH 6, bei 25 °C 3 Minuten lang inkubiert und der Grenzwert der Präzipitation bei 50% gemessen.

Kaninchenserum Nr.	Serumverdünnung bei		Serumverhältnis		Serumverdünnung bei Epimastigot	
	Epimastigot	Sphäromastigot	Epimastigot	Sphäromastigot	5mM Colchicin	1,5% Concanavalin A
32	$1:40 \times 10^3$	$1:1,4 \times 10^2$	1:300		$1:40 \times 10^3$	$1:40 \times 10^3$
33	$1:5 \times 10^3$	$1:0,2 \times 10^2$	1:300		$1:5 \times 10^3$	$1:5 \times 10^3$
34	$1:20 \times 10^3$	$1:0,3 \times 10^2$	1:600		$1:20 \times 10^3$	$1:10 \times 10^3$
35	$1:20 \times 10^3$	$1:0,3 \times 10^2$	1:600		$1:10 \times 10^3$	$1:20 \times 10^3$
36	$1:20 \times 10^3$	$1:0,7 \times 10^2$	1:300		$1:20 \times 10^3$	$1:20 \times 10^3$
37	$1:5 \times 10^3$	$1:0,2 \times 10^2$	1:300		$1:5 \times 10^3$	$1:5 \times 10^3$

2.6 Zur Biopterinspezifizität der Colchicinhemmung

Die Frage, wie weit Colchicin spezifisch den Biopterintransport hemmt, wurde mit verschiedenen Aminosäuren, Nucleosiden und Kohlenhydraten untersucht. Die in Tabelle 7 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß der Biopterintransport unter den gegebenen Bedingungen am stärksten von Colchicin gehemmt wird.

Tab. 7. Hemmwirkung von 5 mM Colchicin auf den Einbau verschiedener Substrate durch *Crithidia fasciculata*. Die Zellen wurden im logarithmischen Wachstum am 4. Tag gesammelt und 2 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, gewaschen. Inkubationsbedingungen: $2,5 \times 10^8$ Zellen pro Probe; 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6; Inkubation für 2 Stunden bei 25°C.

Substrat	Konzentration (µM)	Hemmwirkung (%)
(2- ¹⁴ C)Biopterin	1,3	75,8
(8- ³ H)Guanosin	0,01	40,5
(8- ¹⁴ C)Guanin	0,83	0
(2- ³ H) Adenosin	0,01	0
(5,6- ³ H)Uridin	0,07	0
(2- ¹⁴ C)Thymidin	2	0
(U- ¹⁴ C)L-Valin	0,83	0
(U- ³ H)L-Prolin	0,4	30
(U- ¹⁴ C)D-Fructose-1,6-diphosphat	1,7	14
(U- ¹⁴ C)D-Glucose	1	12,5

2.7 Bindung des Colchicins an die Membranoberfläche

Nach den bisher gezeigten Daten scheint Colchicin nur schwach an der Zelloberfläche gebunden zu werden. Die Bindungsstärke wurde durch mehrfaches Waschen der Zellen mit verschiedenen Verfahren geprüft. Die Ergebnisse aus Abb. 14. bestätigen, daß die Bindung des Colchicins an die Membranoberfläche sehr schwach ist.

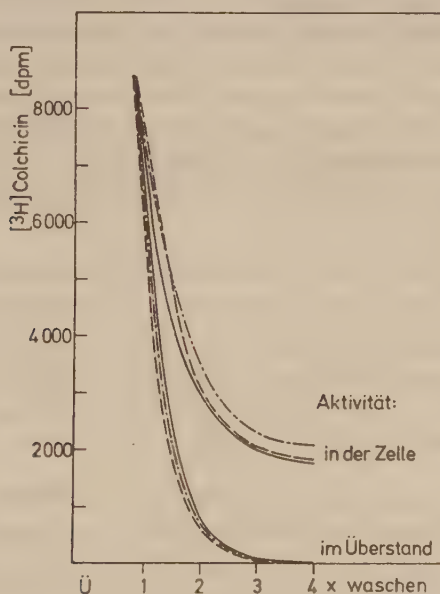


Abb. 14. Auswaschversuche mit ^3H -Colchicin bei *Crithidia fasciculata* unter verschiedenen Bedingungen. *Crithidia* wurde 2 mal in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, aufgenommen. Jede Probe enthielt 0,5 ml Lösung mit $2,5 \times 10^8$ Zellen. Inkubation mit 0,025 mM (Ring C-methoxyl- ^3H)Colchicin 2 Stunden lang bei 25°C. Die abzentrifugierten Zellen wurden danach in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, wie folgt behandelt: 30 Sekunden lang in Anwesenheit von 0,025 mM Colchicin stark geschüttelt (—), in Anwesenheit von 0,025 mM Colchicin sanft mit der Hand geschüttelt (---), ohne Colchicinzusatz sanft mit der Hand geschüttelt (-.-.-). Die Radioaktivität wurde in 0,1 ml des Überstandes und in den gesamten Zellen gemessen.

Starkes oder schwaches Schütteln der Zellen beim Waschen oder Zugabe von kaltem Colchicin zur Waschlösung haben auf das Auswaschverhalten keinen Einfluß. Eine genauere statistische Analyse der Inkorporation (Tabelle 8) zeigt aus dem Variationskoeffizienten, daß bei zweimaligem Waschen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielt wird.

Tab.8. Statistische Analyse der ^3H -Colchicin-Inkorporation bei 2 mal waschen. Eine 4 Tage gewachsene Kultur wurde 2 mal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und die Probe in Versuch 1 mit 0,025 mM, die der Versuche 2 und 3 mit 0,05 mM (Ring C-methoxyl- ^3H)Colchicin 2 Stunden lang bei 25°C inkubiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden für die anschließenden 2 Waschungen mit 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, kurz aufgeschüttelt, erneut abzentrifugiert und dann verbrannt.

Versuch Nr.	1	2	3
Meßproben (n)	10	10	16
Durschnitt pro Probe (dpm)	1230	2295	2885
Sigma-Wert	84,5	150,6	151,4
Variationskoeffizient (%)	6,87	6,56	5,25

Beim Waschen der Zellen auf Zellulosefiltern (Sartorius 116, regenerierte Zellulose) wird mit der gleichen 0,1 M Phosphatpufferlösung ^3H -Colchicin vollständig ausgewaschen.

Mit den folgenden Versuchen wurden einige Parameter geprüft, welche einen Einfluß auf die Colchicinbindung haben könnten.

Die Temperatur hat keinen Einfluß auf die Stabilität der Colchicinbindung bei *Crithidia fasciculata*, wie Tabelle 9 zeigt.

Tab. 9. Einfluß der Temperatur auf die Colchicinbindung. 5×10^8 Zellen/ml wurden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, suspendiert und in 0,5 mM (Ring C-Methoxyl- ^3H) Colchicin 15 Minuten lang bei 25°C inkubiert. Danach wurden jeweils 4 Proben mit 0,5 ml bei 25°C und 4°C abzentrifugiert und 2 mal gewaschen. Anschließend wurden die Proben verbrannt und gemessen. Die angegebene Werte sind der Durchschnitt der jeweils 4 Proben.

Temperatur	dpm
4 °C	3 447
25 °C	3 409

Phosphat oder Sulfat verschiedener Molarität beeinflusst die Colchicinbindung bei *Crithidia* nicht. (Tabelle 10).

Tab. 10 Einfluß verschiedener Phosphat- oder Sulfatkonzentrationen auf die Colchicinbindung an *Crithidia fasciculata*. Eine 4 Tage gewachsene Kultur wurde 2 Stunden mit 0,025 mM (Ring C-Methoxyl- ^3H) Colchicin bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Lösungen 2 mal gewaschen. Die angegebene Radioaktivität ist in $2,5 \times 10^8$ Zellen enthalten.

M Phosphat	dpm	M Sulfat	dpm
0,1	2 310	0,1	2 127
0,25	2 394	0,25	1 831
0,5	2 731	0,5	2 000
1	2 647	0,75	2 012

Eine Sättigung der Colchicinbindung wird nicht erreicht (Tabelle 11). Offenbar wird der Hemmstoff hauptsächlich unspezifisch gebunden. Die Restmenge Colchicin, die nach Abbildung 14 vorhanden ist, hat keinen Einfluß auf den Biopterintransport.

Tab. 11. Konzentrationsabhängigkeit der Colchicinbindung bei *Crithidia fasciculata*. $2,5 \times 10^8$ Zellen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, bei 25°C eine Stunde lang in verschiedenen Konzentrationen (Ring C-Methoxyl- ^3H)Colchicin inkubiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden 2 mal mit Phosphatpuffer gewaschen.

^3H -Colchicin Konzentration (mM)	Gebundenes Colchicin ($\mu\text{Mol}/2,5 \times 10^8$ Zellen)	Colchicin gebunden/frei (%)
0,5	$1,2 \times 10^{-3}$	0,48
1	$5,1 \times 10^{-3}$	1,02
2,5	$9,3 \times 10^{-3}$	0,74
5	$21,2 \times 10^{-3}$	0,84
7,5	$25,7 \times 10^{-3}$	0,94
10	40×10^{-3}	0,8
25	55×10^{-3}	0,44
50	162×10^{-3}	0,65

2.8 Schwankungen in der Colchicinbindung

Mit synchronisierten Kulturen von *Crithidia fasciculata* beobachteten Edwards, Mathew and Lloyd (107) eine Oszillation in der zellulären Konzentration von ATP, ADP, AMP und in der Atmung. Auch bei anderen Trypanosomen wird unter der Einwirkung von Harnstoff (108) oder eines Temperaturschocks (109)

Synchronie induziert. Bei Behandlung der Zellen mit Colchicin deutet sich ein ähnlicher Effekt an (Abb. 15). Die Werte für eine zeitabhängige Änderung des Einbaus streuen allerdings zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen so stark, daß sich eine signifikante Oszillation der Colchicinbindung bei *Crithidia* nicht beweisen läßt.

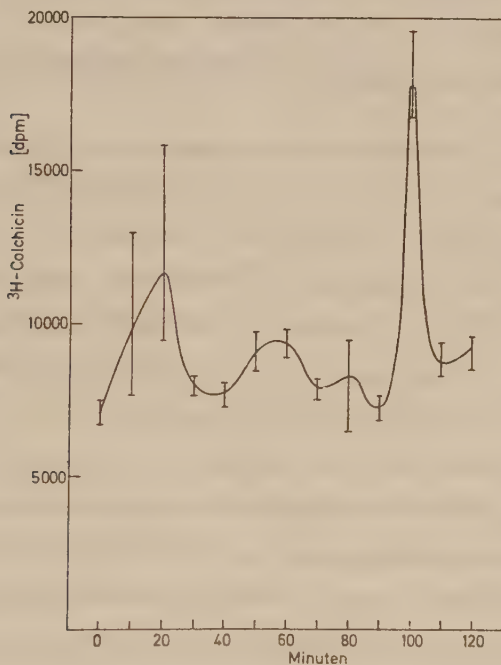


Abb. 15 Zeitabhängige Änderung der Colchicinbindung bei *Crithidia fasciculata*. *Crithidia*zellen wurden geerntet, 2 mal wie üblich gewaschen und danach in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, mit 0,01 mM (Ring C-Methoxyl- ^3H)Colchicin bei 25°C inkubiert. Davon wurden in Abständen von 10 Minuten jeweils 3 mal 0,5 ml Proben entnommen, gewaschen, verbrannt und gemessen. Der Durchschnitt der 3 Messungen und den zugehörigen Extremwerte wurden aufgezeichnet.

3. Behandlung der Membranoberfläche

Die Frage, ob Rezeptoren oder Permeasen für den Biopterintransport nachzuweisen sind, wurde mit zwei Methoden untersucht. Einerseits wurden durch osmotischen Schock (27) Membrankomponenten in Lösung gebracht, andererseits mit Proteasen Membranproteine an der Zelloberfläche angedaut (28, 31).

3.1 Einfluß von osmotischem Schock auf den Biopterintransport

Nach einem osmotischen Schock, entsprechend dem von Heppel (27) beschriebenen Verfahren, sind die Zellen noch intakt und bewegen sich; nur ein geringer Teil von etwa 3% wird lysiert. So behandelte Crithidiazellen verlieren kein aufgenommenes Biopterin (Tabelle 12). Umgekehrt sind osmotisch geschockte Zellen unverändert in der Lage, Biopterin aufzunehmen. Um während der zweistündigen Inkubation eine Neusynthese von Biopterin-Carrier-Komponenten auszuschalten, wurden Cycloheximid (110) und Paromomycin (111) als wirkungsvolle Inhibitoren der Proteinsynthese bei *Crithidia fasciculata* benützt. Wie die Daten der Tabelle 12 zeigen, bauen osmotisch geschockte Crithidiazellen Biopterin auch in Gegenwart von Hemmstoffen der Proteinsynthese ungehindert ein. Eine biopterinspezifische Komponente im Transportsystem wird also, falls überhaupt vorhanden, unter osmotischem Schock nicht aus der Zellmembran entfernt.

Tab. 12. Einfluß des osmotischen Schocks auf den Biopterineinbau und-abfluß bei *Crithidia fasciculata*. Beim Biopterinabflußversuch (2) wurden Proben mit jeweils $2,5 \times 10^8$ Crithidiazellen in 0,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, suspendiert und 2 Stunden lang bei 25°C mit (2-¹⁴C)Biopterin (1,36 uM, 6 mCi/mMol) inkubiert. Anschließend wurde die Kontrolle (1) 2 mal gewaschen und Probe (2) wurde nach Heppel (27) osmotisch geschockt. Bei den Biopterin-Einbauversuchen (3, 4, 5) wurden osmotisch geschockte Zellen (5×10^8 Crithidiazellen/ml) unter den gleichen Bedingungen 2 Stunden lang mit (2-¹⁴C) Biopterin (1,36 uM, 6 mCi/mMol) inkubiert. Die Radioaktivität wurde in den abzentrifugierten Zellen bestimmt.

Experiment	dpm
1. Nach Biopterineinbau (Kontrolle)	2 092
2. " " osmotisch geschockt	2 245
3. Biopterineinbau nach osmotischem Schock	2 753
4. wie 3., + 10 µg/ml Cycloheximid	2 700
5. wie 3., + 0,1 mg/ml Paromomycin	2 780

Bindungsstudien mit Colchicin führen zu einem ähnlichen Ergebnis (Tab. 13). Osmotisch geschockte Zellen scheinen etwas mehr Colchicin zu binden (3) als die unbehandelte Kontrolle (1) und Inhibitoren der Proteinsynthese (4, 5) führen zu einer etwas schwächeren Colchicinbindung. Mit Colchicin präinkubierte Zellen scheinen den schwach gebundenen Hemmstoff unter osmotischem Schock (2 verglichen mit 1) in entsprechender Weise zu verlieren, wie es in Abb. 14 für das Auswaschverhalten gezeigt ist. In der Tat wird der Biopterineinbau in osmotisch geschockte Zellen durch Colchicin (9, 10, 11) praktisch unverändert beeinflusst. Damit ist bewiesen, daß keine Colchicin bindenden Membranbestandteile unter osmotischem Schock heraus-

gelöst werden, die für den Biopterintransport verantwortlich sind.

Tab. 13. Einfluß des osmotischen Schocks auf die Colchicinbindung bei *Crithidia fasciculata*. Inkubationsbedingungen: $2,5 \times 10^8$ Crithidiazellen wurden in jeder Probe in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, suspendiert, in 0,05 mM (Ring C-Methoxyl- ^3H)Colchicin bei 25°C 1 Stunde lang inkubiert und danach osmotisch geschockt (erste 5 Versuche). Bei den darauffolgenden Versuchen wurden die Zellen nach osmotischem Schock (27) in ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterin ($1,3 \mu\text{M}$, 6 mCi/mMol) unter den selben Bedingungen inkubiert. Die Radioaktivität wurde in den abzentrifugierten Zellen bestimmt.

Behandlung der Zellen	Inkubation (h)	dpm
1. nach Colchicinbindung unbehandelte Kontrolle	1	2.264
2. nach Colchicinbindung osmotisch geschockt	1	1 136
3. Colchicinbindung nach osmotischem Schock	1	2 933
4. wie 3., + 10^{-2} mM Cycloheximid	1	2 083
5. wie 3., + 0,1 mg/ml Paromomycin	1	2 113
6. ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterineinbau, unbehandelte Kontrolle	2	2 368
7. wie 6., + 5 mM Colchicin	2	883
8. ($2\text{-}^{14}\text{C}$)Biopterineinbau nach osmotischen Schock	2	2 864
9. wie 8., + 5 mM Colchicin	2	1 020
10. wie 8., + 5 mM Colchicin, + 10^{-2} mM Cycloheximid	2	996
11. wie 8., + 5 mM Colchicin, + 0,1 mg/ml Paromomycin	2	1 054

3.2 Einfluß der Protease-Behandlung auf den Biopterintransport

Der Biopterineinbau in mit Trypsin oder Papain vorbehandelte Zellen wird nicht verändert, wie die Daten in Tabelle 14 zeigen. Andere Transportsysteme werden dagegen deutlich beeinflusst. Der Transport von Prolin und Valin wird durch Behandlung der Crithidiazellen mit Papain stark, mit Trypsin dagegen überhaupt nicht gehemmt. Dem entgegengesetzt wird der Einbau von Zuckern und von Colchicin, wie auch im Falle des Biopterins, überhaupt nicht beeinflusst.

Tab. 14. Effekt von Trypsin und Papain auf den Einbau von Biopterin, Prolin, Valin, Galactose, Fructose und Colchicin in *Crithidia fasciculata*. 0,5 ml Proben mit $2,5 \times 10^8$ Crithidiazellen, suspendiert in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, werden bei 25°C inkubiert. Die Proben mit Proteasen werden 30 Minuten vor der Zugabe von Isotopen inkubiert. Die Radioaktivität wurde in den abzentrifugierten Zellen bestimmt.

Behandlung der Zellen	Inkubation (Min.)	dpm
1. 3,4 μ M (2- 14 C)Biopterin	120	4 440
2. wie 1., + Trypsin, 0,1 mg/ml	120	4 336
3. wie 1., + Papain, 0,01 mg/ml	120	4 112
4. 2,5 μ M (U- 3 H)L-Prolin	20	110 319
5. wie 4., + Trypsin, 0,1 mg/ml	20	119 841
6. wie 4., + Papain, 0,01 mg/ml	20	89.390
7. 500 μ M (U- 14 C)L-Valin	20	23 134
8. wie 7., + Trypsin, 0,1 mg/ml	20	28 177
9. wie 7., + Papain, 0,1 mg/ml	20	9 406

10. 2,2 μM ($\text{U-}^{14}\text{C}$)Galactose	120	8 842
11. wie 10., + Trypsin, 0,1 mg/ml	120	11 230
12. wie 10., + Papain, 0,01 mg/ml	120	9 852
13. 0,7 μM ($\text{U-}^{14}\text{C}$)D-Fructose	60	3 813
14. wie 13., + Trypsin, 0,1 mg/ml	60	3 597
15. wie 13., + Papain, 0,01 mg/ml	60	4 903
16. 50 μM (Ring C-Methoxyl- ^3H)Colchicin	60	972
17. wie 16., + Trypsin, 0,1 mg/ml	60	913
18. wie 16., + Papain, 0,01 mg/ml	60	911

Die Proteasebehandlung greift die Membran an einer anderen Stelle an, als der osmotische Schock. Dies zeigen die Ergebnisse in Tabelle 15 für die beiden Aminosäuren Prolin und Valin.

Tab. 15. Einfluß von Papain und osmotischem Schock auf den Einbau von Prolin und Valin in *Crithidia fasciculata*. Proben mit jeweils $2,5 \times 10^8$ Crithidiazellen pro 0,5 ml Lösung, suspendiert in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, wurden 15 Minuten lang bei 25°C inkubiert. Papain wurde 30 Minuten vor der Zugabe von Isotopen mit den Proben inkubiert. Der osmotische Schock wurde nach der Methode von Heppel (27) durchgeführt, die Radioaktivität in den abzentrifugierten Zellen bestimmt.

Behandlung der Zellen	dpm
1. 2,5 μM ($\text{U-}^3\text{H}$)L-Prolin	24 806
2. wie 1., + Papain, 0,01 mg/ml	9 672
3. wie 1., osmotisch geschockte Zellen	23 528
4. 500 μM ($\text{U-}^{14}\text{C}$)L-Valin	18 736
5. wie 4., + Papain, 0,01 mg/ml	7 600
6. wie 4., osmotisch geschockte Zellen	9 101

DISKUSSION

Mit den in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Daten soll diskutiert werden, ob Bioplerin durch einen Leitungsmechanismus zu einem bestimmten Kompartiment der Zelle geführt wird. Wie könnte dies erfolgen und wie wird das Pterin von außen nach innen transportiert? Bewegungen an der Membranoberfläche oder in der Zelle lassen sich nur mit großen Molekülen wie den Proteinen relativ leicht beobachten. Die dazu meist benützten Techniken, Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie, lassen sich für kleine Moleküle nur bedingt verwenden. Bei diesen Molekülen können ähnliche Beobachtungen mit der Autoradiographie durchgeführt werden. Die Anwendung dieser Methode stößt bei Bioplerin dadurch auf Schwierigkeiten, daß die physiologischen Konzentrationen sehr niedrig sind. Auch mit sehr hoch markiertem Bioplerin muß eine sehr hohe Expositionszeit gewählt werden (im Bereich von Jahren), um 30 bis 50 Punkte pro Zelle zu bilden. Deshalb untersuchten wir auf indirektem Wege die Eigenschaften solcher Transportvorgänge. Dabei verdienen die Mikrotubuli, Rezeptoren und Permeasen besondere Aufmerksamkeit. Wie schon in der Einleitung beschrieben, befinden sich die Mikrotubuli bei Crithidia an der Innenseite der zytoplasmatischen Membran und die Rezeptoren sind ein notwendiges Element für das Kappen-Phänomen.

Die Hemmung des Bioplerintransports durch Colchicin läßt sich nicht aus einer Hemmung der Mikrotubuli erklären. Daß sie trotzdem im Bioplerintransport mitwirken, läßt sich aber nicht ausschließen, da bei Crithidia das Colchicin die Zellmembran offen-

bar nicht penetriert, eine Wechselwirkung mit Tubulin also gar nicht möglich ist. Folgende Punkte sind hervorzuheben:

1. Colchicin hemmt den Biopterintransport erst in Konzentrationen von über 1 mM. Die Colchicin-Konzentration zur Hemmung der Tubulinpolymerisation liegt dagegen im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-3} mM (105). Mizel und Wilson (103), Cheng und Katsoyannis (104), Ständler und Franke (112) haben mit verschiedenen Säugetierzellen gezeigt, daß zur Hemmung des Transports von Nukleosiden und Zuckern Colchicinkonzentrationen im millimolaren Bereich nötig sind. Diese Konzentrationsunterschiede sprechen dafür, daß sich Colchicin entweder an andere Strukturen als an die Mikrotubuli bindet, oder daß es einen starken Einfluß auf die Membranpermeabilität ausübt.
2. Bei hoher Biopterinkonzentration beeinflusst Colchicin das Crithidia-Wachstum nicht. Würde Colchicin in die Zelle gelangen, dann würde es die Neubildung von Mikrotubuli hemmen, unabhängig von der Biopterinkonzentration im Medium. Das bedeutet, daß Colchicin überhaupt nicht in die Crithidiazelle hineinkommt.
3. Die Form der Crithidiazelle ändert sich nicht, was ebenfalls bestätigt, daß Colchicin und auch Vinkristin nicht in die Zelle hineinkommen. Es ist aus vielen Arbeiten bekannt (Bardale (113), Tylney (114) und andere), daß die Mikrotubuli für die Erhaltung der Zellform wichtig sind und daß sie von Colchicin angegriffen werden

4. Die Colchicinbindung ist bei Crithidia verschieden von der hydrophoben Bindung des Colchicins an die Mikrotubuli. Die Verschiedenheit zeigt sich in folgenden Befunden:

- Die Colchicinbindung ist unabhängig von der Phosphat- und Sulfatkonzentration und von der Temperatur. Die hydrophobe Colchicin-Mikrotubulibindung reagiert dagegen sehr empfindlich auf diese Faktoren.
- Die Colchicinbindung ist im Vergleich zur Colchicin-Mikrotubulibindung unspezifisch. Eine eventuelle spezifische Bindung wäre bei sehr geringen Konzentrationen gesättigt und auf keinen Fall für die Hemmung des Biopterintransports verantwortlich.
- Eine Schwankung der Bindungskapazität ist bei der Mikrotubuli-Colchicinbindung nicht bekannt.
- Das leichte Herauswaschen des Colchicins aus der Crithidiazelle zeigt, daß, wenn überhaupt eine Bindung vorhanden ist, diese schwächer sein muß als die hydrophobe Colchicin-Mikrotubulibindung.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Hemmwirkung des Colchicins auf einer sehr schwachen Bindung oder Assoziation an der Außenseite der Zellmembran beruht, oder aber von einem nicht bekannten Mechanismus ausgelöst wird.

Benötigt der Biopterintransport spezifisch bindende Proteine? Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Biopterintransport vom osmotischen Schock nicht beeinflußt wird. Auch eine Behandlung der Zellen mit Trypsin und Papain zeigt keine Wirkung auf den Biopterintransport. Diese negativen Ergebnisse führen zu der Frage, ob der osmotische Schock und die Proteasebehandlung

bei *Crithidia fasciculata* eine wirksame Methode für das Studium von Transportsystemen sind. Es könnte sein, daß Rezeptoren oder Permeasen von Biopterin und anderen Substraten durch diese Methoden nicht angegriffen werden. Gegen eine solche Annahme sprechen folgende Befunde, von denen die unter 2. und 3. angeführten in noch unveröffentlichten Untersuchungen erhoben worden sind.

1. Der osmotische Schock wirkt auf den Valintransport.
2. Der osmotische Schock löst Membrankomponenten heraus, die von Papain und Trypsin angegriffen werden.
3. Der osmotische Schock löst Membrankomponenten heraus, die mit *Crithidia fasciculata*-Antikörpern reagieren und einen Niederschlag bilden.

Aus diesen Ergebnissen können wir schließen, daß sowohl der osmotische Schock als auch die Proteasebehandlung bei *Crithidia* Transportvorgänge wirkungsvoll beeinflussen. Wie weit sich dies jedoch verallgemeinern läßt und damit auch für den Biopterintransport zutrifft, ist unklar. Die vorliegenden Ergebnisse reichen zwar nicht aus, um diese Frage zu klären, sie sind aber ein wichtiger Hinweis darauf, daß Biopterin für seinen Transport keine spezifischen Rezeptoren oder Permeasen benötigt. Mit einem klaren Beweis, daß Biopterin keinen Rezeptor benötigt, wäre auch ein zweidimensionaler Transport auf der Membranoberfläche auszuschließen.

Das wahrscheinliche Fehlen von Rezeptoren und Permeasen in der Membran ist auch ein starker Hinweis auf die Unspezifizität des Carriers beim Biopterintransport. Ein solch spezifischer Carrier ist durch eine spezifische Permease gekennzeichnet, die entweder durch den osmotischen Schock oder die Proteasebehand-

dlung angegriffen werden müßte, was aber nicht der Fall ist. Umgekehrt bedeutet ein solches Ergebnis, daß viele unspezifische Carrier das Biopterin transportieren können. Damit ist die Transportwahrscheinlichkeit wesentlich höher als mit einem spezifischen Carriersystem. Eine solche Unspezifizität gilt allerdings nicht für alle Carrier, da zum Beispiel Folsäure und Aminopterin ein eigenes Carriersystem besitzen, das von Biopterin nicht benützt werden kann (20). Für Biopterin bedeutet dies, daß nur eine sehr geringe Menge des Wachstoffs im Medium vorhanden sein muß, da eine große Zahl von Transportsystemen an der Zelloberfläche zur Verfügung stehen. Ein solcher Mechanismus unterliegt aber auch einer Vielzahl regulatorischer Prozesse. Wie sich auch aus den Arbeiten von Vaubel (15, 115) ergibt, wird der Biopterintransport durch Substanzen chemisch sehr verschiedener Klassen beeinflußt. Die Ergebnisse mit Colchicin zeigen, daß die Hemmung von unspezifischen Bindungen hervorgerufen wird und deshalb nach osmotischem Schock der Zelle noch genauso wirkungsvoll ist. Mizel und Wilson (103) beobachteten, daß die Hemmwirkung des Colchicins auf den Nucleosidtransport bei Säugerzellen nicht über Permeasen erfolgen kann, sondern unspezifische Carrier oder ein anderer Mechanismus der Zelle regulatorische Funktionen hat. Bei Crithidia bedeutet der Colchicineffekt, daß der Biopterintransport zwar am stärksten, aber nicht als einziges System gehemmt wird. Allerdings werden diese Ergebnisse dadurch eingeschränkt, daß nur acht verschiedene Substanzen untersucht wurden. Am Galactosetransport von E. coli, wo ebenfalls ein großes Konzentrations-

gefälle zwischen außen und innen besteht (1:2.00), sind verschiedene Galactose-Carrier beteiligt (116).

Wenn man die vorliegenden Argumente zusammenfaßt, besteht die Möglichkeit, daß Biopterin durch das Zusammenwirken unspezifischer Carrier von außen nach innen transportiert und anschließend auf ein Leitungssystem übertragen wird, das dann das Biopterinmolekül zu dem entsprechenden intrazellulären Kompartiment transportiert.

ZUSAMMENFASSUNG

Bioplerin ist ein essentieller Wachstoffs für *Crithidia fasciculata*. Es wurde untersucht, ob bei seinem aktiven Transport ein Leitungsmechanismus vorhanden ist, der den Wachstoffs zu seinem Kompartiment führt. Wesentliche Elemente eines solchen Transportsystems sind die durch Colchicin beeinflussbaren Mikrotubuli. Colchicin hemmt in Konzentrationen von 10^{-3} M kompetitiv den Bioplerintransport. Ein direkter Einfluß auf die Mikrotubuli ist aber unwahrscheinlich, da es nicht in die Zelle hineinkommt und diese unterschiedliche Bindungseigenschaften als die der Tubulin-Colchicin-Wechselwirkung aufweist.

Obwohl der osmotische Schock und die Permeasenbehandlung bei gewissen Transportsystemen von *Crithidia fasciculata* eine Wirkung haben, konnte dies beim Bioplerintransport nicht beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß weder spezifische Rezeptoren noch Permeasen an diesem Transportsystem beteiligt sind. Mit dem Fehlen von Rezeptoren läßt sich auch eine Kopplung von Bewegung an der Zelloberfläche mit dem Bioplerintransport ausschließen. Die Abwesenheit spezifischer Rezeptoren läßt vermuten, daß der Transport von außen nach innen über unspezifische Carrier erfolgt, was mit anderen Beobachtungen über die Hemmwirkung sehr verschiedener Substanzen und mit thermodynamischen bzw. ökonomischen Vorstellungen in Einklang steht.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Stephens S. W. W., Fantham H. B. (1910): On the peculiar morphology of a Trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*Trypanosoma rhodesiense*). Proc. Roy. Soc. B. 83, 28.
2. Fantham H. B. (1911): The history of *Trypanosoma gambiense* and *rhodesiense* as seen in rats and guinea-pigs. Ann. Trop. Med. Paras. 4, 465.
3. Chagas C. (1909): Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1, 159-218.
4. Angepoulos E. (1970): Pellicular microtubules in the family Trypanosomatidae. J. Protozool. 17(1), 51-70..
5. Brooker B.E. (1970): Desmosomes and hemidesmosomes in the flagellate *Crithidia fasciculata*. Z. Zellforsch. 105, 155-156.
6. Hoare C. A. (1966): Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: A new terminology. Nature 212(5068), 1385-1386.
7. Enders B., Gumgerer K. D., Zwisler O. (1972): Zur Serodiagnose der Chagaserkrankung und der Bilharziose des Menschen. Behring Inst. Mitt. 52, 86-97.
8. Newton B. A. (1972): Recent studies on the mechanism of action of Berenil (Diminazene) and related compounds. Comparative Biochemistry of Parasites. Ed. H. van der Bosche. Academic Press Inc.
9. Brown G. M. (1972): The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides. J. Biol. Chem. 237(2), 536-540.

10. Richter W. E., McCormack J. J. (1974): Inhibition of mammalian dihydrofolate reductase by selected 2,4-diaminoquinazolines and related compounds. J. Med. Chem. 17(9), 943-947.
11. Gutteridge W. E., Knowler J., Coombes J. D. (1969): Growth of *Trypanosoma cruzi* in human heart tissue cells and effects of aminonucleoside of puromycin, trypacidin and aminopterin. J. Protozool. 16(3), 521-525.
12. Gutteridge W. E., McCormack J. J., Jaffe J. J. (1969): Presence and properties of dihydrofolate reductases within the genus *Crithidia*. Bioch. Bioph. Acta 178, 453-458.
13. Henderson G. B., Huennekens F. M. (1974): Transport of folate compounds into *Lactobacillus casei*. Arch. Bioch. Biophys. 164, 722-728.
14. Shane B., Stokstad E. L. R. (1975) Transport and metabolism of folates in bacteria. J. Biol. Chem. 250(6), 2243-2253.
15. Rembold H., Vaubel A., Rao P.J. (1974): Effect of sugars, Na⁺-, and K⁺-Ions on bioppterin transport in *Crithidia fasciculata*. Arch. Microbiol. 97, 51-62.
16. Rembold H., Gyure W. L. (1972): Biochemie der Pteridine. Angewandte Chemie 22, 1088-1098. Internat. Edit. 11, 1061-1071.
17. Patterson E. L., Milstrey R., Stokstad E. L. R. (1956): The synthesis of a pteridine required for the growth of *Crithidia fasciculata*. J. Amer. Chem. Soc. 78, 5868-5871.
18. Kaufman S. (1963): The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. Biochemistry 50, 1085-1092.
19. Rembold H., Buff K. (1972): Tetrahydrobiopterin, a cofactor in mitochondrial electron transfer. Effect of tetrahydropterins on intact rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 28, 579-585.

20. Rembold H., Vaubel A. (1970): Energy-dependent transport of pteridines into the Trypanosomid flagellate, *Crithidia fasciculata*. Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 351, 1277-1279.
21. Berlin R. D. (1975): Microtubules and the fluidity of the cell surface. Ann. N. Y. Acad. Sci. 253, 445-454.
22. Wunderlich F., Müller R., Speth V. (1973): Direct evidence for colchicine-induced impairment in the mobility of membrane components. Science 182, 1136-1138.
23. Price M. T. (1974): The effects of colchicine and lumicolchicine on the rapid phase of axonal transport in the rabbit visual system. Brain Res. 77, 497-501.
24. Mayhew D. E., Carrol T. W. (1974): Barley stripe mosaic virions associated with spindle microtubules. Science 185, 957-958.
25. Dales S. (1975): Involvement of the microtubules in replication cycles of animal viruses. Ann. N. Y. Acad. Sci. 253, 440-444.
26. Schafer R. (1973): Acetylcholine: fast axoplasmic transport in insect chemoreceptor fibers. Science 180, 315-317.
27. Heppel L. A. (1967): Selective release of enzymes from bacteria. Science 156, 1451-1455.
28. Tsan M. F., Taube R. A., Berlin R. D. (1973): The effect of trypsin on membrane transport of non-electrolytes. J. Cell Physiol. 81, 251-256.
29. Pardee A. B. (1975): The cell surface and fibroblast proliferation. Some current research trends. Bioch. Byoph. Acta 417, 153-172.
30. Hunt R. C., Brown J. C. (1975): Identification of a high molecular weight trans-membrane protein in mouse L cells. J. Mol. Biol. 97, 413-422.

31. Wallach D. F. H. (1972): The dispositions of proteins in the plasma membranes of animal cells: analytical approaches using controlled peptidolysis and protein labels. *Bioch. Bioph. Acta* 265, 61-83.
32. Silhavy T. J., Boos W., Kalckar H. M. (1974): The role of the *Escherichia coli* galactose transport and chemotaxis. *Biochemistry of Sensory Functions*. Ed. Jaenicke L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
33. Hack A., Klingmüller W. (1971): Wirkung von osmotischen Schock und Triton Behandlung auf den Sorbose-Transport von *Neurospora* Zellen. *Z. Naturf.* 26(3), 250-255.
34. Anraku Y. (1968): Transport of sugars and amino acids in bacteria. I. Purification and specificity of the galactose and leucine-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 243(11), 3116-3122.
35. Anraku Y. (1968): Transport of sugars and amino acids in bacteria. II. Properties of galactose and leucin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 243(11), 3123-3127.
36. Anraku Y. (1968): Transport of sugars and amino acids in bacteria. III. Studies on the restoration of active transport. *J. Biol. Chem.* 243(11), 3128-3135.
37. Iwashima A., Matsura A., Nose Y. (1971). Thiamine-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Bacter.* 108(3), 1419-1421.
38. Olmsted J. B., Borisy G. G. (1973): Microtubules. *Ann. Rev. Bioch.* 507-540.
39. Slautterback D. B. (1963): Cytoplasmic microtubules 1. *Hydra*. *J. Cell Biol.* 18, 367-388.
40. Forer A., Blecher S. R. (1975): Appearances of microtubules after various fixative procedures and comparison with the appearances of tobacco mosaic virus. *J. Cell Sci.* 19, 579-603.

41. Tilney L. G., Bryan J., Bush D. J., Fujiwara K., Mooseker M. S., Murphy D. B., Snyder D. H. (1973): Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59, 267-275.
42. Bryan J., Wilson L. (1971): Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 8(8), 1762-1766.
43. Olmsted J. B., Witman G. B., Carlson K., Rosenbaum J. L. (1971): Comparison of the microtubule proteins of neuroblastoma cells, brain and chlamydomonas flagella. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68(9), 2273-2277.
44. Dales S. (1972): Concerning the universality of a microtubule antigen in animal cells. *J. Cell Biol.* 52, 754-758.
45. McIntosh J. R. (1974): Bridges between microtubules. *J. Cell Biol.* 61, 166-187.
46. Hauser M. (1972): Differentielles Kontrastverhalten verschiedener Mikrotubulisysteme nach Mercury Orange-Behandlung. *Cytobiologie* 6(3), 367-381.
47. Thomas M. B. (1970): Transitions between helical and protofibrillar configurations in roublet and singlet microtubules in spermatozoa of *Stylochus zebra* (Turbellaria, Polycladida). *Biol. Bull.* 138, 219-234.
48. Thomas M. B., Henley C. (1971): Substructure of the cortical singlet microtubules in spermatozoa of macrostomum (Platyhelminthes, Turbellaria) as revealed by negative staining. *Biol. Bull.* 141, 592-601.
49. Lindemann C. B., Gibbons I. R. (1975): Adenosin triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with triton X-100. *J. Cell Biol.* 65, 147-162.
50. Douglas G. J. (1975): Sliding filaments in sperm flagella. *J. Theor. Biol.* 53, 247-252.

51. Holwill M. E. J., Mc Gregor J. L. (1974): Micromanipulation of the flagellum of *Crithidia oncopelti*. I Mechanical effects. J. Exp. Biol. 60, 437-444.
52. Vickerman K., Preston T. M. (1970): Spindle microtubules in the dividing nuclei of Trypanosomes. J. Cell Sci. 6, 365-383.
53. Bryan J. (1972): Definition of three classes of binding sites in isolated microtubule crystals. Biochemistry 11(14), 2611-2616.
54. Wilson L., Bamberg J. R., Mizel S. B., Grisham L. M., Creswell K. M. (1974): Interaction of drugs with microtubule proteins. Fed. Proc. 33(2), 158-166.
55. Borisy G. G., Taylor E. W. (1967): The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicin-³H to cellular protein. J. Cell Biol. 34, 525-533.
56. Borisy G. G., Taylor E. W. (1967): The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. J. Cell Biol. 34, 535-548.
57. Shelansky M. L., Taylor E. W. (1967): Isolation of a protein subunit from microtubules. J. Cell Biol. 34, 549-554.
58. Singer S. J., Nicolson G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731.
59. Singer S. J. (1974): On the fluidity and asymmetry of biological membranes. Perspectives in membrane biology. Ed. Estrada-O.S., Gitler C. Academic Press, N. Y.-San Francisco-London, 131-142.
60. Frye L. D., Edidin M. (1970): The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. J. Cell Sci. 7, 319-335.

61. Pinto da Silva P. (1972): Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts. *J. Cell Biol.* 53, 777-787.
2. Waksman A., Rendon A. (1974): Intramitochondrial large amplitude protein movements. I. A possible novel aspect of membrane fluidity. *Biochemie* 56, 907-924.
63. Eletr S., Inesi G. (1972): Phase changes in the lipid moieties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformational changes. *Bioch. Bioph. Acta* 288, 231-236.
64. Rudy B., Gitler C. (1972): Microviscosity of the Cell Membrane. *Bioph. Bioph. Acta* 288, 231-236.
65. Yahara I., Edelman G. M. (1975): Modulation of lymphocyte receptor mobility by concanavalin A und Colchicin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253, 455-469.
66. Petris S., Raff M. C. (1973): Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. *Nature N. Biol.* 241, 257-259.
67. Yahara I., Edelman G. M. (1975): Electron microscopic analysis of the modulation of lymphocyte receptor mobility. *Exp. Cell Res.* 91, 125-142.
68. Nicolson G. L. (1976): Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over all surface components. *Bioch. Bioph. Acta* 457, 57-108.
69. Minor P. D., Roscoe D. H. (1975): Colchicine resistance in mammalian cell lines. *J. Cell Sci.* 17, 381-396.
70. Ling V., Thomson L. H. (1974): Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol.* 83, 103-116.

71. Aubin J. E., Carlsen S. A., Ling V. (1975): Colchicine permeation is required for inhibition of concanavalin A capping in chinese hamster ovary cell . Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72(11), 4516-4520.
72. Albertini D. F., Clark J. I. (1975): Membrane-microtubule interactions: concanavalin A capping induced redistribution of cytoplasmic microtubules and colchicine binding proteins. Proc. Nat. Acad. Scie. USA 72(12), 4976-4980.
73. Oliver J. M., Ukena T. E., Berlin R. D. (1974): Effects of phagocytosis and Colchicin on the distribution of lectin-binding sites on cell surface. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71(2), 394-398.
74. Tsan M. F., Berlin R. D. (1971): Effect of phagocytosis on membrane transport of nonelectrolytes. J. Exp. Med. 134, 1016-1035.
75. Ukena T. E., Berlin R. D. (1972): Effect of colchicine and vinblastine on the topographical separation of membrane functions. J. Exp. Med. 136, 1-7.
76. Pinto da Silva P., Martinez-Palomo A., Gonzales-Robles A. (1975): Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. J. Cell Biol. 64(4), 538-550.
77. Wunderlich F., Speth V., Batz W., Kleinig H. (1973): Membranes of Tetrahymena. III. The effect of temperature on membrane core structures and fatty acid composition of Tetrahymena cells. Bioch. Bioph. Acta 298, 39-49.
78. Speth V., Wunderlich F. (1973): Membranes of Tetrahymena. II. Direct visualization of reversible transitions in biomembrane structure induced by temperature. Bioch. Bioph. Acta 296, 621-628.
79. Doyle J. J., Behin R. (1975): Antibody-induced movement of protozoan surface membrane antigens. Ann. N. Y. Acad. Sci. 254, 315-325.

80. Brooker B. E. (1970): The fine structure of *Crithidia fasciculata* with special reference to the organelles involved in the ingestion and digestion of protein. *Z. Zellforsch.* 116, 532-563.
81. Brown K. N., Armstrong J. A., Valentine R. C. (1965): The ingestion of protein molecules by blood forms of *Trypanosoma rhodesiense*. *Exp. Cell Res.* 39, 129-135.
82. Langreth S. G., Balber A. E. (1975): Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* 22(1), 40-53.
83. Preston T. M. (1969): The form and function of the cytopharynx of the culture forms of the Elasmobranch Haemoflagellate *Trypanosoma raiiae* Laveran & Mesnil. *J. Protozool.* 16(2), 320-333.
84. Martinez-Palomo A., Souza W., Gonzalez-Robles A. (1975): Topographical heterogeneity of surface coat and membrane particles of *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Biol.* 67(2), A264-A264 (meeting Abstract).
85. Messier P. (1971): Sub-pellicular microtubules in *Crithidia fasciculata*. *J. Protozool.* 18(2), 223-231.
86. Easterbrook K. B. (1971): The ultrastructure of *Crithidia fasciculata*. A freeze-etching study. *Can. J. Microb.* 17, 277-279.
87. Guttman H. N. (1963): *Crithidia* assay for unconjugated pteridines. *Exp. Parasit.* 129(14), 255-266.
88. Lowry O. H., Rosenbroug N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
89. Lübbers D. W., Windisch E. (1963): Die Messung hoher Sauerstoffdrücke in kleinen Gas- oder Flüssigkeitsmengen mit der Pt-Elektrode. *Pflügers Archiv* 276, 429-434.
90. Boehringer Mannheim (1975): *Biochemica Information* II, 69-70.

91. Rembold H., Metzger H. (1963): Synthese und chromatographische Trennung von $(8\alpha^{-14}\text{C})$ Biopterin und $(8\alpha^{-14}\text{C})7$ -Biopterin. Ber. 96, 1395-1405.
92. Brooker B. E. (1971): Flagellar attachment and detachment of Crithidia fasciculata to the gut wall of Anopheles gambiae. Proto-
plasma 73, 191-202.
93. Clark T. B., Kellen W. R. Lindegren J. E., Smith T. A. (1964):
The transmission of Crithidia fasciculata Leger 1902 in Culi-
seta incidens (Thomson). J. Protozool. 11(3), 400-402.
94. Weimberg R., Orton W. L. (1965): Elution of acid phosphatase from
the cell surface of Saccharomyces mellis by Potassium Chloride.
J. Bacteriol. 90(1), 82-94.
95. Demis D. J., Rothstein A., Meier R. (1954): The relationship of
the cell surface to metabolism. X. The location and function
of invertase in the yeast cell. Arch. Biochem. Bioph. 48, 55-62.
96. Gascón S., Neumann N. P., Lampen J. O. (1968): Comparative study
of the properties of the purified internal and external inver-
tase from yeast. J. Biol. Chem. 243(7), 1573-1577.
97. Anonymous (1971): Escape from Lysosomes. Nature New Biol. 233,
223-223. (Eeckhout Y. Doktor Arbeit).
98. Wilson L. (1975): Minirev. Action of drugs on microtubules. Life
Sci. 17(3), 303-310.
99. Wilson L. (1970): Properties of colchicine binding protein from
chick embryo brain. Interactions with Vinca Alkaloids and podo-
phyllotoxin. Biochemistry 9(25), 4999-5007.
100. Wilson L., Friedkin M. (1967): The biochemical events of mitosis.
II. The in vivo and in vitro binding of colchicine in grasshopper
embryos and its possible relation to inhibition of mitosis.
Biochemistry 6(10), 3126-3135.

101. Bensch K. G., Malawista S. E. (1969): Microtubular crystals in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 40, 95-107.
102. Becker J. S., Oliver J. M., Berlin R. D. (1975). Fluorescence techniques for following interactions of microtubule subunits and membranes. *Nature* 254, 152-154.
103. Mizel S. B., Wilson L. (1972): Nucleoside transport in mammalian cells. Inhibition by colchicine. *Biochemistry* 11(14), 2573-2578.
104. Cheng K., Katsoyannis P. G. (1975): The inhibition of sugar transport and oxidation in fat cells ghosts by colchicine. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 64(3), 1069-1075.
105. Schindler R. (1965): Structure-activity relationship in a series of colchicine analogs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 149(3), 409-416.
106. McGhee R. B., Hanson W. L. (1963). The relationship of various Crithidias as determined by serological reactions. *J. Protozool.* 10(2), 239-243.
107. Edwards C., Staham M., Lloyd D. (1975): The preparation of large-scale synchronous cultures of the Trypanosomatid, *Crithidia fasciculata*, by cell-size selection: Changes in respiration and adenylate charge through the cell-cycle. *J. Gen. Microb.* 88, 141-152.
108. Steinert M. (1969): Reversible inhibition of the division of *Crithidia luciliae* by hydroxyurea and its use for obtaining synchronized cultures. *FEBS Letters* 5(4), 291-294.
109. Newton B. A. (1957): The mode of action of phenanthridines: the effect of ethidium bromide on all division and nucleic acid synthesis. *J. Gen. Microb.* 17, 718-730.
110. Hill R. C., Morris C. A., Weber M. M. (1975): Chloramphenicol resistant mitochondrial protein synthesis in *Crithidia fasciculata*. *Arch. Bioch. Bioph.* 170, 392-399.

111. Dixon H. (1974): Effect of inhibitors of bacterial protein synthesis on *Crithidia fasciculata* and *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 21, 450-450.
112. Stadler J., Franke W. W. (1974): Characterization of the colchicine binding of membrane fractions from rats and mouse liver. J. Cell Biol. 60, 297-303.
113. Bardele C. F. (1963): Struktur, Biochemie und Funktionen der Microtubuli. Cytobiologie 7(4), 442-488.
114. Tilney L. G. (1971): Origin and continuity of microtubules. Origin and continuity of cell organelles, Ed. Reinert J., Ursprung H., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2, 222-260.
115. Vaubel A.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
116. Kalckar H. M. (1971): The periplasmic galactose binding protein of *E. coli*. Science 174, 557-565.

Am Ende dieser Arbeit danke ich für die Anleitung Herrn Prof. Dr. H. Rembold, der durch stetiges Interesse, zahlreiche Diskussionen und nicht zuletzt auch bei der sprachlichen Abfassung in entscheidender Weise die Arbeit unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen danke ich für die Einführung ins Max-Planck-Institut für Biochemie.

Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller habe ich für anregende Diskussionen zu danken.

Frau S. Rohrschneider hat durch ihre gewissenhafte technische Mitarbeit, für die ich mich bedanke, einen wichtigen Beitrag geleistet.

Für die Hilfe bei den immunologischen Arbeiten bin ich Herrn Dr. J. Eder zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 29. 8. 1945 wurde ich als Sohn von Karl und Else Lotte Langenbach in Rio de Janeiro, Brasilien, geboren. Die Schule besuchte ich zwischen 1952 und 1963, während der ersten zwei Jahren in Rio de Janeiro, danach in Petrópolis im Instituto Carlos A. Werneck. 1964 legte ich die Aufnahmeprüfung für die Landwirtschaftliche Universität in Rio de Janeiro ab. Dieses Studium beendete ich Ende 1967. 1968 besuchte ich einen Fortbildungskurs im Biophysikalischen Institut der Universität von Rio de Janeiro. Zwischen 1969 und 1972 arbeitete ich an diesem Institut im Molekularbiologischen Labor. 1973 begann ich mit der Anfertigung einer Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München bei Prof. H. Rembold.

